

Aus dem Anatomischen Institut (Lehrstuhl II)
der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G. Petry

VERGLEICHENDE ANALYSEN AM PROTEINMUSTER DER FOLLIKELFLÜSSIGKEIT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

RAINER ENGELS

aus Aachen

Marburg 1976

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Anatomischen Institut (Lehrstuhl II)
der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G. Petry

VERGLEICHENDE ANALYSEN AM PROTEINMUSTER DER FOLLIKELFLÜSSIGKEIT

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

RAINER ENGELS

aus Aachen

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
Universität Marburg am 28. Januar 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer.nat. H. Beier

Correferent: Prof. Dr. med. G. Petry

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	4
	1) Morphologische Betrachtungen und Definitionen der Follikelentwicklung unter besonderer Berücksichtigung der Follikelflüssigkeit	4
	2) Gewinnung der Follikelflüssigkeit	6
	3) Histologische Färbungen	8
	4) Biochemische Methoden	8
	5) Herstellung von Antisera	11
III.	Befunde	13
	1) Histologische Kontrolluntersuchungen der punktierten Follikel des Rindes	13
	2) Protein-biochemische Untersuchungen des Blutserums und der Follikelflüssigkeit des Rindes	18
	3) Histologische Kontrolluntersuchungen der punktierten Follikel des Schweines	31
	4) Protein-biochemische Untersuchungen des Blutserums und der Follikelflüssigkeit des Schweines	35
	5) Protein-biochemische Untersuchungen des Blutserums und der Follikelflüssigkeit des Menschen	45
IV.	Diskussion	
	1) Entstehung der Follikelflüssigkeit	54
	2) Proteinstoffe der Follikelflüssigkeit	55
	3) Proteinkonzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit vom Rind, Schwein und Menschen (quantitative Unterschiede)	58
	4) Die physiologischen Funktionen der Follikelflüssigkeit	63
V.	Zusammenfassung	67
VI.	Literaturverzeichnis	69

I. Einleitung

Das Ovar ist aufgrund seiner endokrinen Schlüsselstellung für den weiblichen Gesamtorganismus und wegen der besonderen Bedeutung für den Reproduktionsvorgang immer wieder Gegenstand morphologischer und biochemischer Untersuchungen gewesen. Ein aktuelles Forschungsproblem ist nach wie vor die Steuerung der Ovulation. Mit morphologischen Methoden wurden bereits von PETRY (1949, 1951) in umfangreichen Studien, besonders am Bindegewebe des Ovars, die zur Ovulation führenden Vorgänge in der Follikelwand vor ihrer Ruptur analysiert. In jüngster Zeit haben endokrinologische und biochemische Methoden zu weitreichenden Erkenntnissen in der hormonellen Regulation des Ovulationsmechanismus geführt. Diese Befunde waren so umfassend, daß eine praktische Anwendung dieses Wissens nehelag. Damit wurden die Voraussetzungen zur endokrinologisch-pharmakologischen Beeinflussung der Ovulation geschaffen.

Was biochemisch und endokrinologisch an der Eizelle geschieht, ist bisher wenig bekannt. Wir wissen nicht, wie die Oozyte im Zeitraum zwischen der Anlage im Primordialfollikel und dem Verlassen der Follikelhöhle bei der Ovulation einerseits von den ovariellen Geweben und andererseits dem gesamten Endokrinium bezüglich ihrer Reifung und Befruchtungsfähigkeit beeinflusst wird. Da die Cozyten im Tertiärfollikel keinen direkten Kontakt mit dem mütterlichen Gefäßsystem haben, müssen dem sie umgebenden Milieu ganz spezifische Aufgaben zur Erhaltung ihres Stoffwechsels und möglicherweise wichtige endokrine Mittlerfunktionen zufallen. Zur Klärung dieser physiologischen Aufgaben ist es wünschenswert, ein möglichst genaues Bild von der Zusammensetzung der die Eizelle umgebenden Follikelflüssigkeit zu erhalten. Darüber hinaus stellt sich bei einer solchen Untersuchung auch die Frage, ob die Bedeutung der Follikelflüssigkeit allein in regulativen und nutritiven Funktionen für die Oozyte besteht, oder ob der Follikelflüssigkeit

auch Einflüsse auf die Auslösung der Ovulation (PETRY, 1943, 1949), sowie auf Reaktionen und Wechselbeziehungen nach der Ovulation, wie z.B. auf Capacitation und Befruchtung zu kommen (vgl. Übersicht bei EDWARDS, 1974).

Untersuchungen der physikalischen und anorganisch-chemischen Eigenschaften der Follikelflüssigkeit verschiedener Spezies wurden von ODEBLAD (1952), LUTWAK-MANN (1954), OLDS und VANDEMARK (1957), ZACHARIAE und JENSEN (1958) sowie SHALGI, KRAICER und SOFERMAN (1972) ausgeführt. Arbeiten über Kohlenhydrate, Mucopolysaccharide, Lipide, Vitamine und Coenzyme liegen von LUTWAK-MANN (1954), ODEBLAD (1954), CARAVAGLIOS und CILOTTI (1957), JENSEN und ZACHARIAE (1958), CERLETTI und ZICHELLA (1961), ZACHARIAE (1957) und von BYSKOV (1969) vor. Bei den protein-biochemischen Untersuchungen von CARAVAGLIOS und CILOTTI (1957), SHIVERS, METZ und LUTWAK-MANN (1964), DESJARDINS, KIRTON und HAFS (1966), MANARANG-PANANG und MENGE (1971), McGAUGHEY und DANIEL (1972) sowie SHALGI, KRAICER und SOFERMAN (1972) kamen in den meisten Fällen lediglich papier- und immunoelektrophoretische Methoden zur Anwendung. Während die Papierelektrophorese eine sehr geringe Selektivität besitzt, ist die Identifizierung von Proteinen in der Immunoelektrophorese durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern außerordentlich genau. Demgegenüber zeichnet sich die Disk-Elektrophorese durch eine hohe Selektivität aus, die durch die Trennung der Proteine im elektrischen Feld und den gleichzeitigen Molekularsiebeffekt zustandekommt. Diese Vorzüge erweisen sich als besonders wertvoll, wenn eine Untersuchung von Proteingemischen angestrebt wird, für deren einzelne Fraktionen keine Antikörper vorliegen. Faßt man die Befunde der Disk-Elektrophorese und diejenigen der Immunoelektrophorese desselben Untersuchungsmaterials zusammen, läßt sich ein befriedigendes Analyseergebnis erreichen.

Die vorliegende Studie demonstriert das Proteinspektrum der Follikelflüssigkeit besonders im Hinblick auf Unterschiede zum Serumproteinmuster. Die hier schwerpunktmäßig angewandte Disk-Elektrophorese stellt die heute empfindlichste Methode zur Charakterisierung von Proteingemischen in Körperflüssigkeiten dar. Diese Technik ist daher besonders geeignet, mögliche Unterschiede oder Besonderheiten der Proteinmuster nachzuweisen. Immunologische Methoden werden zusätzlich eingesetzt, um einzelne Proteinfractionen auf Organ- und Artspezifitäten zu analysieren. Aus vergleichend reproduktionsphysiologischer Sicht erschien es wünschenswert, mehrere Spezies zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit enthält daher die Analysen und Befunde am Blutplasma und den Follikelflüssigkeiten des Rindes, des Schweines und des Menschen.

II. Material und Methoden

1.) Morphologische Betrachtungen und Definitionen der Follikelentwicklung unter besonderer Be- rücksichtigung der Follikelflüssigkeit

Da die Ovarialfollikel keine biologischen Einheiten darstellen, die unverändert im ovariellen Stroma liegen, sondern vielmehr erst durch vielfältige morphologische und physiologische Umwandlungsprozesse zu funktionsfähigen Graaf'schen Follikeln heranreifen, sollte man bei der Untersuchung der Follikelflüssigkeit die morphologischen Aspekte der Follikelreifung nicht unbeachtet lassen. Umfangreiche Untersuchungen über die Morphologie des Ovariums und der Follikelreifung liegen von PETRY (1951), BRAMBELL (1960), BJÖRKMAN (1962), ZUCKERMAN (1962), LOBEL und LEVY (1968) und ZAMBONI (1972) vor.

Das Follikelwachstum läßt im wesentlichen zwei Phasen unterscheiden (ZUCKERMAN 1962). Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der Oozyte, die am Ende dieser Phase nahezu ihre endgültige Größe erreicht. In der zweiten Phase erfolgt die Größenzunahme des Follikels hauptsächlich durch Hyperplasie der Granulosa und Theka und die Ansammlung von Follikelflüssigkeit in der Follikelhöhle (LOBEL und LEVY 1968). Zum Zeitpunkt der Geburt liegen die Ovarialfollikel als Primordialfollikel dicht unter der Oberfläche des Ovars. In diesen Primordialfollikeln ist die Oozyte umgeben von einer einzigen Lage platter Granulosazellen. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von ZAMBONI (1974) ist dieser Zellverband so lückenhaft, daß ein Stoffaustausch zwischen Oozyte und Blutplasma sowohl über Interzellularspalten der Granulosa, als auch über einen direkten Kontakt zwischen Oozyte und Kapillare stattfinden kann. In dieser Form liegen die Follikel im Ovar, bis einige von ihnen durch einen bisher unbekannten Reiz veranlaßt werden zu wachsen. Dieses

Wachstum ist einerseits gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der Eizelle, andererseits durch eine physiologische und morphologische Veränderung der Granulosazellen, die kuboidal bis zylindrisch werden und sich vermehren, so daß eine mehrschichtige Membrana granulosa entsteht. LOBEL und LEVY (1968) vermuten einen induktiven Einfluß der sich zuerst vergrößernden Oozyte auf das Wachstum der Granulosazellen.

Wenn die Eizelle ihre endgültige Größe erreicht hat (BRAMBELL 1928, PARKES 1931), und die Membrana granulosa aus 5 - 6 Zellschichten besteht, kommt es ebenfalls durch induktive Wirkung von Seiten der Eizelle und der Membrana granulosa zur Bildung eines perifollikulären Kapillargeflechtes und der Umwandlung von Zellen des umgebenden Stromas zu Theka-Zellen. In den folgenden Stadien kann man eine gefäßreiche und, abgesehen von einigen Retikulinfasern, faserarme Theca interna von einer an Kollagenfasern reichen Theca externa unterscheiden, in der sich ein zweites Gefäßnetz findet. Die Membrana granulosa bleibt bis zur Ovulation gefäßlos. Sie ist durch eine Basalmembran von der Theca interna getrennt.

Erst nach Ausbildung der Theka-Zellschichten erscheinen innerhalb der Granulosa Interzellularspalten, die mit einer mehr oder weniger viskösen Flüssigkeit gefüllt sind, von ROBINSON (1918) als "primärer Liquor folliculi" bezeichnet. Diese Interzellularräume wurden erstmals im Kaninchenfollikel von CALL und EXNER (1875) beschrieben. Nach BRAMBELL (1960) entstehen sie entweder aus zugrunde gegangenen und verflüssigten Granulosazellen oder aufgrund sekretorischer Aktivitäten der Granulosa. HADEK (1963) macht mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen deutlich, daß es sich bei der primären Follikelflüssigkeit um ein Sekretionsprodukt der Granulosazellen handelt. Die "Call-Exner-Bodies" identifiziert er als intrazelluläre cytoplasmatische Tröpfchen, die ebenfalls in

den Interzellularraum abgegeben werden. Unter weiterem Wachstum des Follikels vereinigen sich die Flüssigkeitsansammlungen, und die vielen Interzellularspalten und erweiterten Hohlräume bilden schließlich die Follikelhöhle, an deren Wand die Oocyte in den Cumulus oophorus eingebettet liegt. Im letzten präovulatorischen Reifungsstadium kommt es zu einer beträchtlichen Vermehrung der Follikelflüssigkeit und zum Untergang der Granulosazellen des Cumulus oophorus bis auf eine radiär um die Oocyte angeordnete Zellschicht, die Corona radiata. Die in dem so entstandenen Tertiärfollikel enthaltene Flüssigkeit nennt ROBINSON (1918) "sekundären Liquor folliculi". Demzufolge werden die in der vorliegenden Studie beschriebenen Untersuchungen am sekundären Liquor folliculi durchgeführt.

2.) Gewinnung von Follikelflüssigkeit

Für die vorliegende Arbeit wurden 23 Follikelflüssigkeitsproben vom Rind, 22 Proben vom Schwein und 3 Punktate vom Menschen untersucht. Zur Gewinnung der Follikelflüssigkeiten vom Rind und Schwein wurden die Ovarien von Schlachttieren verwendet, die ich vom Schlachthof Marburg erhielt. Das Untersuchungsmaterial von Rindern und Schweinen eignet sich für unsere Analysen besonders gut, da es den methodischen Vorteil hat, daß reichlich Follikelflüssigkeit in den einzelnen Follikeln enthalten ist. So können mit einer einzigen Follikelflüssigkeitsprobe mehrere Proteinanalysen durchgeführt werden. Bei allen Rindern und Schweinen, die erst auf dem Schlachthof veterinärmedizinisch untersucht werden, ist es nicht möglich, kurzfristig das Reproduktionsstadium zu bestimmen. Wir müssen daher den Nachteil in Kauf nehmen, das Zyklus- bzw. Oestrusstadium des betreffenden Schlachttieres nicht zu kennen. Zur Gewinnung von Blutserum wurde den Tieren zu Beginn des Schlachtvorganges nach Durchtrennung der Halsgefäße Blut entnommen, das nach ausreichendem

der Gerinnung zentrifugiert wurde. Ich habe sorgfältig darauf geachtet, daß die zur Verfügung gestellten Ovarien von den Tieren stammten, denen Blut entnommen worden war, so daß ein exakter analytischer Vergleich am Material desselben Individuums möglich wurde.

Als charakteristisches Zeichen der Geschlechtsreife zeigen die Ovarien eine mannigfaltig durch Tertiärfollikel und Corpora lutea vorgewölbte Oberfläche. Die Größe der Follikel schwankt zwischen 4 und 10 mm Durchmesser beim Schwein und 4 - 15 mm Durchmesser beim Rind. Als Zeichen einer bevorstehenden Ovulation zeigen einige Follikel eine aufgehellte Stelle der Follikelkuppe, die spätere Lokalisierung des Stigmas. Zur Gewinnung von Follikelflüssigkeit wurden die Ovarien mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, und anschließend die Follikel mit einer lang ausgezogenen, scharfrandigen, feinen Glaspipette punktiert. Dabei erhält man eine goldgelbe Flüssigkeit aus Follikeln des Rinderovars und eine balßgelbe Flüssigkeit aus Follikeln des Schweines. Die Viskosität dieser punktierten Follikelflüssigkeit ist beim Rind etwas größer als bei der des Schweines. Außerdem zeigt die Rinder-Follikelflüssigkeit eine stärkere Neigung, schnell zu gerinnen. Um diese Fibrinbildung zu verhindern, wurde den punktierten Flüssigkeiten eine 3,0%ige Natrium-Citrat-Lösung zugesetzt. Die Proben wurden bis zur Analyse tiefgefroren (Laborgefriertruhe -30°C).

Wir gewannen einen Überblick über die morphologische Beschaffenheit der punktierten Follikel und ihrer Nachbarfollikel durch histologische Aufarbeitung. Die histologische Kontrolle ermöglicht zudem den Ausschluß von Follikelzysten.

Das in der vorliegenden Studie untersuchte menschliche Material stammt von in vivo punktierten Follikeln normaler zyklischer Patientinnen, die sich aus diagnostischen Gründen wegen sekundärer Sterilität einer gynäkologischen Laparoskopie (Pelviskopie) unterzogen. Die Technik der Pelviskopie erfolgte nach SEMM (1970) und wurde in der Kieler Universitätsfrauenklinik durchgeführt.

3.) Histologische Färbungen

- a) Haematoxylin-Erythrosin 0,5 % (HE) nach Mayer (ROMEIS 1968).
- b) Azan-Färbung nach Heidenhain (ROMEIS 1968).
- c) Trichrom-Färbung (Masson-Goldner) in der Modifikation nach Jerusalem (ROMEIS 1968).

4.) Biochemische Methoden

a) Proteinbestimmung

Die Gesamteiweißkonzentration wurde mit der Mikro-Biuret-Methode nach GOA (1953) bestimmt. Der Nachweisbereich dieser Methode liegt zwischen 0,1 und 2,0 mg Protein im Analysensatz. Die Eichkurve für diese Bestimmungen wurde auf Trockensubstanz von Kaninchenserum bezogen.

b) Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese

Die Untersuchungen erfolgten mit der von MAURER (1971) ausführlich beschriebenen Methode. Es wurde 6%iges Polyacrylamid (PAA) als Trenngel mit Tris-Glycin-Puffer (pH 9,0) und vorgeschaltetem Sammelgel (2,5%iges PAA) verwandt. Die Elektrophorese wurde in Säulen durchgeführt: Querschnitt 4,7 mm, Länge 60 mm, Laufstrecke 40 mm, Stromstärke 5,0 mA pro Säule. Die aufgetragenen Proteinmengen betrugen 200 - 350 µg.

c) Färbungen im Polyacrylamid

- ca) Amidoschwarz (MAURER 1971) Färbung mit 1%iger Lösung von Amidoschwarz -10B in 7,5%iger Essigsäure. Färbedauer der Säulen eine Stunde. Vorentfärbung in 7,5%iger Essigsäure 12 Stunden, danach elektrophoretische Entfärbung in 7,5%iger Essigsäure.
- cb) PAS-Färbung der Glykoproteine (modifiziert nach KIRCHNER 1969) Einlegen der ungefärbten Gelsäulen für eine Stunde zur Oxydation in ein Perjodbad. Danach 2 - 3 Stunden Auswaschen in 1%iger Trichloressigsäure und 10%iger Essigsäure, anschließend 2 - 5 Stunden Färbung in Fuchsin (2 g Fuchsin, 10 ml konz. Salzsäure, 40 ml 10%ige Trichloressigsäure, 40 ml aqua dest.) Auswaschen in einer Lösung von 2 g $K_2S_2O_5$, 4 ml konz. HCl auf 200 ml aqua dest.
- cc) Sudanschwarz (MAURER 1971) Färbung mit einer Lösung von 500 mg Sudanschwarz in 20 ml Aceton, 15 ml Essigsäure und 80 ml aqua dest. Färbung über 12 Stunden. Entfärbung durch mehrmaliges Waschen in einer Lösung aus 150 ml Essigsäure, 200 ml Aceton und 650 ml aqua dest.

d) Densitometrie der Polyacrylamid-Säulen

Die fotometrische Auswertung der Elektrophoresen erfolgte mit dem Densitometerzusatzgerät (ZK 5) zum Zeiss Spektralphotometer PMQ 3. Um die relativen prozentualen Anteile der einzelnen Protein-

fraktionen zu berechnen, wurden die Extinktionskurven mit einem Planimeter vermessen. Proteinanteile von Fraktionen, deren Extinktionsmaxima über $E=1,0$ lagen, wurden aus geometrisch ergänzten Densitometriepeaks berechnet.

e) Immunochemische Nachweismethoden

ea) Ouchterlony-Test Die Methode wurde von OUCHTERLONY (1958) entwickelt. In Löchern des gepufferten Agargels (Reiniger Behring-Institut, 1%ige Lösung) werden in gewünschter Anordnung Antiseren und Antigene eingefüllt. Die Reaktionspartner diffundieren in den Agar ein und bilden an Stellen, an denen sich die spezifischen Antikörper mit den entsprechenden Antigenen treffen, charakteristische Präzipitationsbanden, deren Form eine Aussage über die Identität von Proteinen zuläßt. Nachdem die Präparate ausgewaschen und getrocknet sind, werden sie zur besseren Identifizierung schwacher Präzipitate mit Amidoschwarz gefärbt.

eb) Immunoelktrophorese Es wurde das von GRABAR und WILLIAMS (1953) entwickelte Verfahren verwandt. Wie beim Ouchterlony-Test reagieren Antigene und Antikörper im gepufferten Agargel miteinander, jedoch werden die zu untersuchenden Antigene zuvor elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend läßt man den Antigenfraktionen die spezifischen Antikörper eines Antiserums aus einer Rille entgegendiffundieren, die längs der Wanderungsstrecke der Antigene in den Agar eingestanzt ist. Dies führt zu bogenförmigen Präzipitaten, die sich nach der Eiweißfärbung mit Amidoschwarz darstellen und identifizieren lassen.

5.) Herstellung von Antiseren

In Abständen von jeweils zwei Tagen wurde acht Kaninchen dreimal hintereinander eine Lösung von gleichen Teilen eines verdünnten Serums bzw. einer verdünnten Follikelflüssigkeit und Freund'schem Adjuvans (Difco) intramuskulär und subcutan infiltrierend injiziert. Die pro Injektion zugeführte Proteinmenge betrug 2,5 mg. Nach einem Zeitraum von jeweils zehn Tagen wurde zweimal mit der gleichen Proteinmenge aufgefrischt (Boosterinjektion). Zur Gewinnung der Antikörper wurde den Kaninchen jeweils alle 10 Tage i.v. Blut entnommen. Diese Antiseren vom Kaninchen wurden zur Klärung der Frage eingesetzt, ob follikelflüssigkeitsspezifische Proteine bei den beiden Arten Schwein und Rind vorkommen.

Für einige immunologische Untersuchungen verwendete ich Antiseren der Behringwerke AG (Marburg):

Anti-Schweineserumprotein-Serum vom Kaninchen,
Anti-Rinderserumprotein-Serum vom Kaninchen,
Anti-Rinderfibrinogen-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanserumprotein-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanpräalbumin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanalbumin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Human- α_1 -Antitrypsin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanorosomucoid-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humencoeruloplasmin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humantransferrin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanlactoferrin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanhaptoglobin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Human- α_2 -Makroglobulin-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanimmunoglobulin-G-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanimmunoglobulin-A-Serum vom Kaninchen,
Anti-Humanimmunoglobulin-M-Serum vom Kaninchen.

6.) Danksagungen

Für die großzügige Unterstützung bei der Beschaffung von Untersuchungsmaterial und die Bereitstellung von Analysenreagenzien bin ich folgenden Herren zu großem Dank verbunden:

Herrn Dr. med. vet. Wandt (Marburg/Lahn) danke ich herzlich für die freundliche Hilfe bei der Gewinnung der Rinder- und Schweineovarien, sowie den entsprechenden Blutproben.

Herrn Prof. Dr. med. K. Semm, Direktor der Universitätsfrauenklinik Kiel, gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der pelviskopischen Follikelpunktionen bei 4 Patientinnen.

Der Behringwerke AG (Marburg/Lahn), vor allem Herrn Professor Dr. phil. H.G. Schwick, danke ich sehr für die Bereitstellung der zahlreichen Antiseren.

III. Befunde

1.) Histologische Kontrolluntersuchungen der punktierten Follikel des Rindes

Die charakteristischen großen Follikel, welche sich an der Oberfläche des Ovariums vorwölben, sind sprungreife oder Graaf'sche Follikel. Alle punktierten großen Follikel wurden histologisch analysiert, um sicher zu gehen, daß sie normale Follikel darstellten, und eine klare Abgrenzung zu Follikelcysten möglich war. Das histologische Bild entspricht dem typischen Schema (Abb. 1). Im Antrum folliculi, dem Hohlraum des Follikels, findet man Flüssigkeitsansammlungen, die durch ihren Proteingehalt auffallen. Die fixierte Follikelflüssigkeit liegt in Form von unterschiedlich stark granuliertem Material vor, das färbereichs gut darstellbar ist (Abb. 2a). Die innere Auskleidung der Follikelhöhle wird von der gefäßfreien Granulosazellschicht gebildet. Von dieser durch eine Basalmembran getrennt, liegt die zell- und gefäßreiche Theca interna. An diese grenzt die faserreiche Theca externa, die fließend, ohne scharfe Grenze in das ovarielle Stroma übergeht. Nach einer Punktion der Follikelflüssigkeit kollabiert in der Regel jeder sprungreife Follikel, da dessen Binnendruck sehr schnell abfällt, wenn der Liquor folliculi abfließt. Die Granulosazellschicht wird schließlich bei den punktierten Follikeln wellenförmig aufgeworfen (Abb. 2c). Nur wenige Granulosazellen lösen sich bei der Punktion aus dem Zellverband und werden mit der punktierten Flüssigkeit ausgeschwemmt. Gegen diese normalen, großen Follikel lassen sich gelegentlich Follikelcysten abgrenzen, die durch eine sehr dünne Granulosazellschicht und eine auffällig starke Bindegewebevermehrung der Thekaschichten auffallen. Die punktierten Flüssigkeiten solcher Follikelcysten wurden nicht in die vorliegende Untersuchung einbezogen.

Abb. 1

Schematische Darstellung der Follikelentwicklung im menschlichen ovariellen Zyklus.

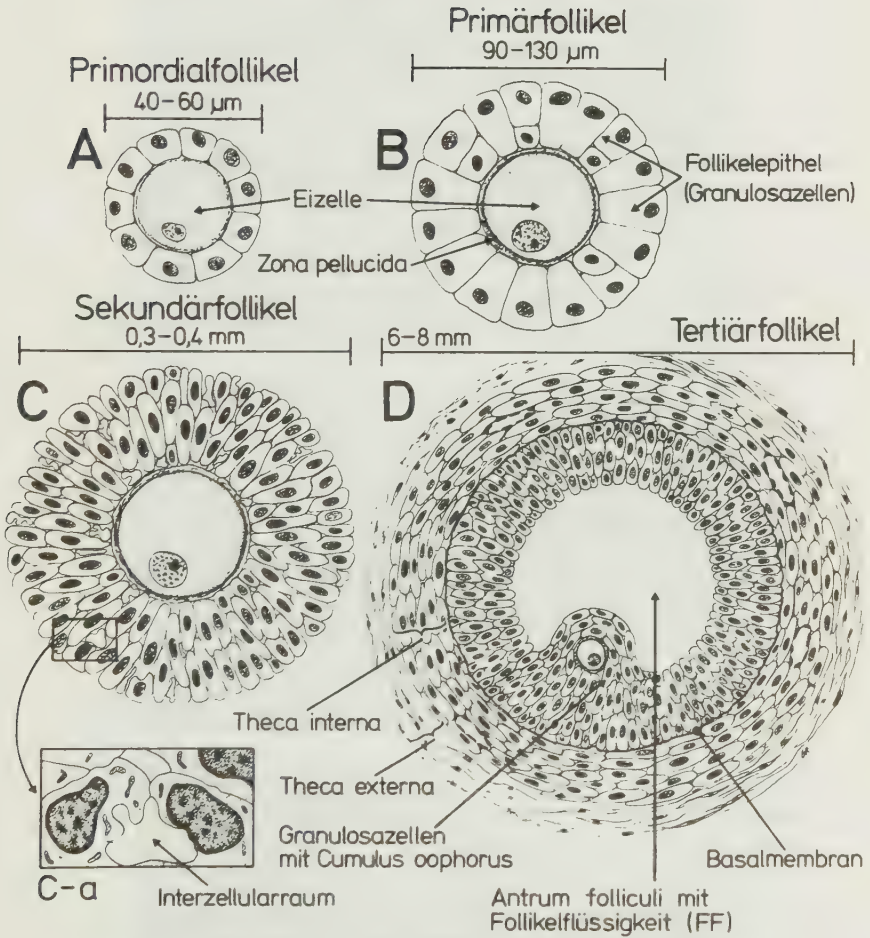
A.) Primordialfollikel. Die Eizelle oder Cozyte bildet mit der sie umgebenden einschichtigen Lage flachkütischer Follikelzellen den Primordialfollikel (z.Zt. der Geburt sind ca. 300.000 angelegt).

B.) Primärfollikel. Während die Mehrzahl der Primordialfollikel durch Atresie zugrunde geht, wachsen einige unter gleichzeitiger Umbildung des Follikelepithels zu Primärfollikeln heran.

C.) Sekundärfollikel. Nur 10.000 - 12.000 Sekundärfollikel reifen aus. In den Interzellularspalten der Membrana granulosa beginnt sich Flüssigkeit zu sammeln (vgl. Ausschnitt-Vergrößerung C-a).

D.) Tertiärfollikel. Während der Geschlechtsreife entwickeln sich unter Gonadotropinstimulation 300 - 400 Follikel über Tertiärfollikel zu sprungreifen GRAAF'schen Follikeln. Im Gegensatz zu Primär- und Sekundärfollikeln findet sich um die Tertiärfollikel eine Theca interna und externa. Follikelflüssigkeit (FF) ist reichlich vorhanden. Die avaskuläre Membrana granulosa wird durch eine Basalmembran von der reich vaskularisierten Theca interna getrennt.

Die Durchmesserangaben auf der Schemazeichnung sind Maße für die Follikelgrößen des Menschen.



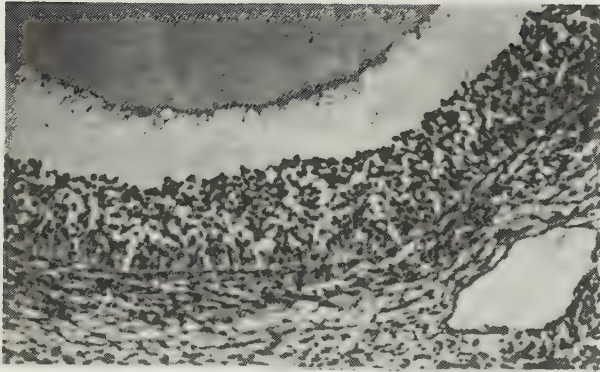
Der Tertiärfollikel wächst zum sprungreifen Follikel, dem sog. Graaf'schen Follikel (16–24mm) heran.

Abb. 2

Histologische Kontrolluntersuchung der punktierten Follikel des Rindes. Die großen, sich an der Oberfläche des Ovariums vorwölbenden Follikel können als sprungreife, sog. Graaf'sche Follikel klassifiziert werden. In der vergleichenden histologischen Gegenüberstellung von nicht-punktiertem (a, b) und punktiertem Follikel (c) wird der normale Schichtenbau der Follikelwand deutlich. Während bei den sprungreifen Follikeln alle Wandschichten gedehnt sind, fällt bei dem punktierten Follikel (c) auf, daß eine starke Faltung der Wand nach Druckabfall durch die Entnahme der Follikelflüssigkeit auftritt. Die nach Fixierung sichtbare Eiweißausfällung der Follikelflüssigkeit ist im Schnittbild (a) gut zu erkennen. Die innere Auskleidung der Follikelhöhle wird von der gefäßfreien Granulosazellschicht gebildet. An diese grenzt die von vielen Kapillaren durchzogene Theka interna. Der Übergang zur Theka externa ist an der veränderten Relation von Zellen zu Fasern zu erkennen, gelegentlich finden sich dort auch größere Gefäße (a).

Vergrößerungen: (a) x 140, (b) und (c) x 350.

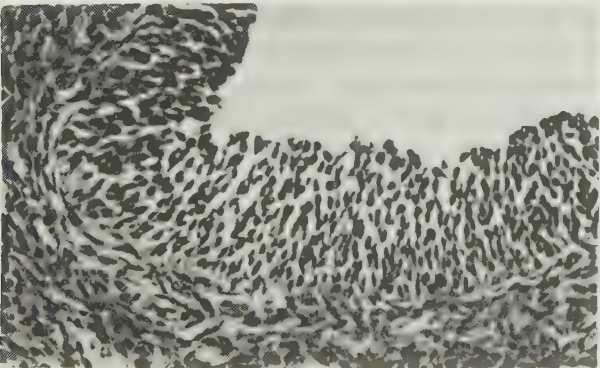
2a



b



c



2.) Protein-biochemische Untersuchungen des
Blutserums und der Follikelflüssigkeit
des Rindes

a) Proteingehalt des Blutserums

Bei 10 untersuchten Rinderseren habe ich mit Hilfe der Mikro-Biuret-Methode einen Gesamtproteingehalt bestimmt, wobei die gemessenen Werte zwischen 6,2 g/100 ml und 9,1 g/100 ml lagen. Der Mittelwert errechnete sich zu 7,6 g/100 ml.

b) Elektrophoretische Untersuchungen des Blutserums

Mittels der Disk-Elektrophorese lassen sich nach Färbung mit Amidoschwarz bis zu 15 Proteinbanden nachweisen. Zur Auswertung der Elektrophoresen teilt man das Spektrum der Proteinbanden zweckmäßigerweise in folgende Fraktionen ein: Präalbuminbereich, Albuminzone, Postalbuminbereich, Hämoexinbereich, Transferrinkomplex, Posttransferrinbereich, Immunglobulin- und Makroglobulinbereich (Abb. 3).

Bei der elektrophoretischen Auftrennung des Rinderserums finden sich keine Präalbumine. Die Albuminzone ist die mit Amidoschwarz am stärksten anfärbbare Fraktion. Die auffällige Breite dieser Fraktion kommt nicht allein durch die quantitativ dominierende Stellung des Albumins zustande, sondern auch durch die nachweisliche Heterogenität dieser gesamten Fraktion. Es wandern bei der relativ kurzen Trennstrecke, die in unserem System angewandt wird, zahlreiche Plasmaproteine neben dem Albumin mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit in dieser Fraktion. Nach Amidoschwarzfärbung ist ihre Unterscheidung nicht möglich. Im Postalbuminbereich kommen ein oder zwei Banden besonders deutlich zur Darstellung. Im Hämoexinbereich lassen sich bis zu 4 Banden gleicher Farbintensität identifizieren. Nach künstlicher Hämolyse durch Zugabe von destilliertem Wasser zu einer Blutprobe erscheinen in diesem Bereich 3 stark angefärbte

Banden, deren mittlere die stärkste färbereische Intensität zeigt (Abb. 4). Der Transferrinkomplex gliedert sich individuell verschieden in 3, 4 oder 5 Banden, von denen die zweite, bzw. die zweite und dritte, jeweils besonders intensiv anfärbbar sind. Der Posttransferrinbereich ist gekennzeichnet durch ein bis zwei Banden, deren zweite sich stärker färbt als die erste. Die Immunglobulin- und Makroglobulinfraktion stellt sich in der Disk-Elektrophorese als einheitlich stark gefärbte Zone dar, in der sich nur wenige Proteinbanden deutlich abheben. So finden sich am Anfang dieser Zone zwei Proteine nahezu gleicher Farbtintensität und in ihrer Mitte eine Bande, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie sich an ihrer Front zwar deutlich abgrenzt, jedoch in Richtung auf die Auftragstelle nur allmählich an Intensität verliert. Den Abschluß des Spektrums bilden zwei Banden, von denen die zweite von solchen Proteinen gebildet wird, die wegen ihrer Molekülgröße nicht in das stark vernetzte Gitterwerk des Polyacrylamids eintreten können und deshalb an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel liegenbleiben.

Mit Hilfe der PAS-Färbung lassen sich Proteine darstellen, in deren Moleküle Kohlenhydratgruppen eingebaut sind. Da die Proteinbanden-Farbtintensität gering ist, lassen sich nur wenige Einzelfraktionen vor einem relativ dunkel angefärbten Hintergrund identifizieren. Sieben Banden sind deutlich zu erkennen (Abb. 3e). Die erste Bande stellt ein im Albuminbereich wanderndes Glykoprotein dar. Hierbei kann es sich um das saure α_1 -Glycoprotein (Drosomucoid) handeln. Im Postalbuminbereich finden sich zwei weitere Banden, von denen die erste dem Protein zuzuordnen ist, das sich bei der Amidoschwarzfärbung unmittelbar hinter dem Albumin abgrenzen läßt. Die zweite Bande stellt möglicherweise zwei dicht zusammenliegende Proteine dar, die sich bei der Amidoschwarz-Färbung deutlich voneinander trennen lassen. Im Transferrinkomplex zeichnet sich das auch bei der Amidoschwarz-

Färbung am stärksten gefärbte Protein durch eine intensive Farbreaktion aus. Die bei der PAS-Färbung am intensivsten gefärbten Banden sind die der Makroglobuline und die der hochmolekularen Proteine, die an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel liegenbleiben. Als Hinweis auf Kohlenhydratgruppen in der Immunglobulinfraktion läßt sich in diesem Bereich eine deutlich erhöhte Hintergrundfärbung deuten. Da sich die PAA-Gele durch hochgradige Transparenz auszeichnen, eignen sie sich sehr für die fotometrische Auswertung. Dabei wird die Menge des an die Proteinmoleküle gebundenen Farbstoffes als proportionales Maß für die Eiweißkonzentration angenommen. So lassen sich die relativen prozentualen Anteile der einzelnen Proteinfraktionen am Gesamteiweißgehalt ermitteln. Zur Beurteilung der Aussagekraft der erhaltenen Meßwerte muß man allerdings einige Fehlerquellen berücksichtigen, die sich aus methodischen Gründen nicht völlig ausschalten lassen.

Wir wissen, daß die verschiedenen Serumproteine in unterschiedlicher Menge Amidoschwarz binden, da außer dem Albumin alle anderen Serumproteine einen unterschiedlichen Kohlenhydratanteil besitzen, d.h. Glycoproteine sind. Außerdem lassen viele Eiweiße bei der elektrophoretischen Trennung einige Moleküle auf dem Trennweg zurück, die bei der Färbung dann eine kometenschweifähnliche Spur hinterlassen, d.h. eine Verstärkung des Hintergrundes bewirken, der sich zur Farbtintensität der einzelnen nachfolgenden Proteinbanden addiert. Die densitometrisch ermittelten Proteinprofile sind in Abb. 5 dargestellt. Die Gegenüberstellung dieser Profile ermöglicht einen quantitativ objektiveren Vergleich zwischen dem Blutserum und der Follikelflüssigkeit als in der Gegenüberstellung der mit Amidoschwarz gefärbten Gele. Für eine genaue quantitative Bestimmung der Proteinfraktionen ist die densitometrische Analyse zwar geeignet, indessen habe ich auf eine quantitative Bestimmung aller Proben verzichtet, da in dieser Arbeit der vergleichende Aspekt der Gesamtproteinmuster im Vordergrund steht, und eine quantitativ auch statistisch abgesicherte Analyse eine weitaus größere

Zahl von Einzelproben berücksichtigen müßte, als es im Rahmen dieser Studie möglich war (Beispiele s. Seite 60).

c) Proteingehalt der Rinder-Follikelflüssigkeit

Bei der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von 18 Rinder-Follikelflüssigkeiten bewegten sich die Werte zwischen 4,9 g/100 ml und 6,2 g/100 ml. Der arithmetische Mittelwert lag bei 5,3 g/100 ml.

d) Elektrophoretische Untersuchung der Follikelflüssigkeit

Bei der Betrachtung einer diskelektrophoretisch aufgetrennten Rinderfollikelflüssigkeit fällt eine fast völlige Übereinstimmung mit dem auf gleiche Weise aufgetrennten Rinderserum auf. Wie beim Serum finden sich in der Follikelflüssigkeit keine Präalbumine. Die Albuminfraktion zeigt die stärkste Farbintensität. Völlige Übereinstimmung zeigt sich im Hinblick auf Anzahl und Farbintensität der Banden im Postalbuminbereich. Ebenso konnte durch den Vergleich von Serum und Follikelflüssigkeit von jeweils demselben Tier festgestellt werden, daß in der Follikelflüssigkeit ebensoviele Transferrinbanden erscheinen wie im Serum. Auch die Farbintensität dieser Banden läßt keinen Unterschied erkennen. Unterschiede zwischen den elektrophoretischen Spektren finden sich erst im Posttransferrin- und Immunglobulinbereich. Hier fällt die allgemein schwächere Anfärbung der Einzelbanden und des Hintergrundes auf. Besonders deutlich wird dies im Bereich der Makroglobuline, die nur in geringer Konzentration vorliegen. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel finden sich so wenige hochmolekulare Proteine, daß eine Färbung nur schwach oder sogar negativ ausfällt.

Nach PAS-Färbung kommen, wie schon im Falle des Serums, 7 einigermaßen deutliche Banden zur Darstellung, wobei

sich wiederum im Immunglobulin- und Makroglobulinbereich im Vergleich zu den Auftrennungen des Serums eine schwächere Anfärbung zeigt (Abb. 3f).

e) Immunologische Analysen der Serum- und Follikelflüssigkeitsproteine des Rindes

Wie Abb. 6 zeigt, können mit den beiden Antiseren gegen Rinderserum und gegen Rinderfollikelflüssigkeit, die ich durch Immunisierung von Kaninchen erhielt, nahezu identische Präzipitatbilder in der Immunoelektrophorese dargestellt werden. Zwei gravierende Unterschiede sind erkennbar: in der Follikelflüssigkeit fehlt ein α_2 -Globulin, das mit Anti-Rinderserum-Serum im homologen Serum ein kräftiges Präzipitat ergibt; und in dem entsprechenden Blutserum fehlt ein an der Auftragstelle lokalisierendes Präzipitat, das mit Anti-Follikelflüssigkeit-Serum in der Follikelflüssigkeit deutlich in diesem β_1 -Bereich ausfällt.

Aufgrund vergleichender Studien und der gleichen Lokalisation im α_2 -Globulin-Bereich handelt es sich bei dem nur im Serum erkennbaren Präzipitat um das α_2 -Makroglobulin. Dieses hochmolekulare Protein ist in der Follikelflüssigkeit nur in geringer Menge vorhanden, ja es kann auch fehlen, wie einige Disk-Elektrophorese-Gele erkennen lassen.

Von großem Interesse ist die Identifizierung des Präzipitates, das sich in der Follikelflüssigkeit, hingegen nicht im Blutserum darstellt. Nach Absorption des Antiserums gegen Follikelflüssigkeit mit homologem Blutserum zeigt sich in der immunoelektrophoretischen Reaktion des absorbierten Antiserums mit Follikelflüssigkeit ein einziges Präzipitat, das zweifellos dem fraglichen β_1 -Globulin entspricht. Zunächst ist nicht auszuschließen, daß dieses Protein ein für

Abb. 3

Proteinmuster vom Blutserum (a,c) und der Follikelflüssigkeit (b,d) des Rindes. Beide Analysenproben stammen jeweils vom selben Tier, um individuelle, genetische Schwankungen im Proteinmuster deutlich darzustellen. Das erste Tier (a,b) zeigt 4 Transferrinbanden, hingegen sind beim zweiten Tier (c,d) 5 Transferrinbanden zu erkennen.

Die Serum- und Follikelflüssigkeitsproben des ersten Tieres wurden zum Vergleich mit der Gesamtproteinfärbung auch mit der PAS-Reaktion dargestellt (Serum = e, Follikelflüssigkeit = f).

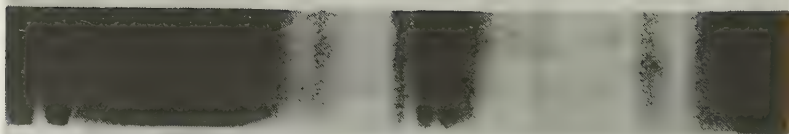
Disk-Elektrophorese, Wanderung der Proteine von links nach rechts, die kräftig gefärbte Bande am rechten Bildrand ist Albumin;

Tris-Glycin-Puffer pH 9.0

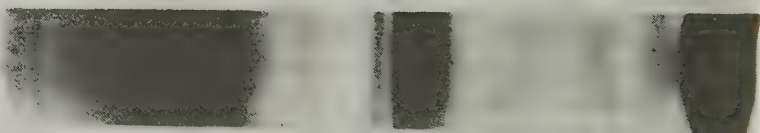
Amidoschwarz-10B-Färbung (a,b,c,d),

PAS-Färbung (e,f).

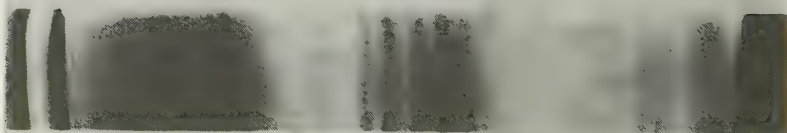
3a



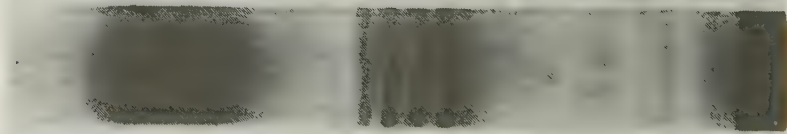
b



c



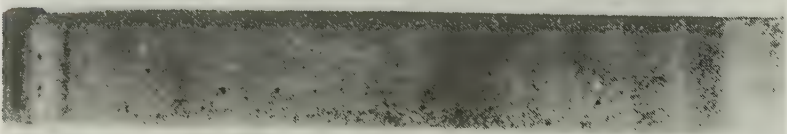
d



e



f



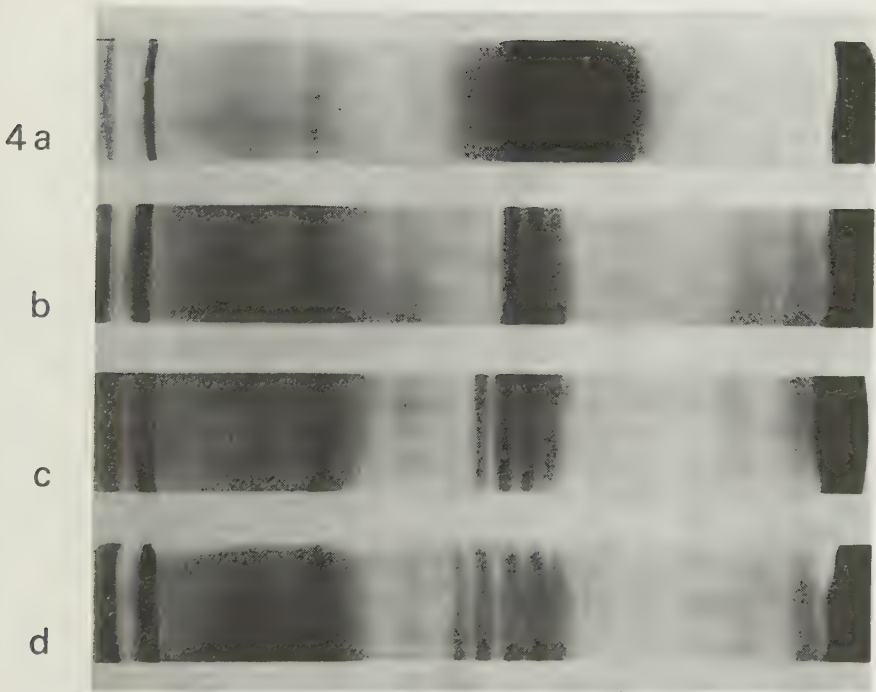


Abb. 4

Proteinmuster des Blutserums des Rindes zur Darstellung des Transferrinpolymorphismus. Das erste Serum (a) wurde als haemolytische Vergleichsprobe aufgetrennt, um zu zeigen, daß die Bande mit der Wanderungsgeschwindigkeit des Haemoglobins nicht mit denen der Transferrine interferiert. Die kräftig anfärbbare Bande am rechten Bildrand ist Albumin. Im Proteinmuster (a) besteht die stark angefärbte mittlere Zone aus zwei Hauptkomponenten, deren schneller wandernde dem Haemoglobin, die langsamere den drei Transferrin-Banden entspricht. Die Transferrine der nicht-haemolytischen Seren kommen in Form von drei (b), vier (c) oder auch fünf (d) Banden vor.

Abb. 5

Elektrophorese-Densitogramme von Rinderserum (a,b,c) und Follikelflüssigkeit (d,e,f). Die abgebildeten Analysenpaare stammen von drei verschiedenen Rindern (a/d, b/e, c/f). Die Ähnlichkeit der Transferrine beider Flüssigkeiten eines jeden Tieres ist auffällig. Die oberen beiden Reihen sind nach Amidoschwarz-Färbung aufgezeichnet, die unteren Densitogramme (c,f) erhielt ich nach PAS-Färbung.

Disk-Elektrophorese, Tris-Glycin-Puffer pH 9.0;

Absorptionen: Amidoschwarz-Färbungs-Aufzeichnung 600 mm,
PAS-Färbung 550 mm.

Abkürzungen: ALB Albumin, AZ Albuminzone, IGF Immunglobulinfraktion, MG Makroglobulinzone, TF Transferrinkomplex.

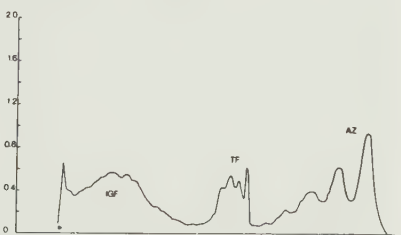
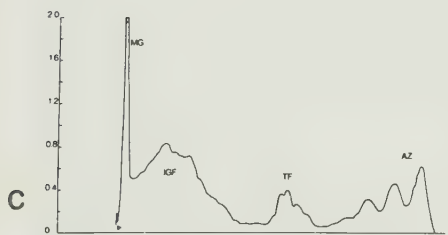
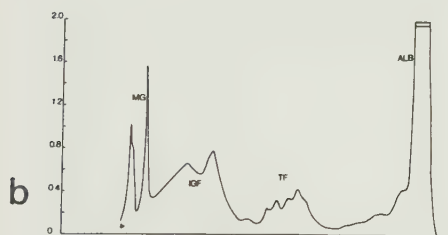
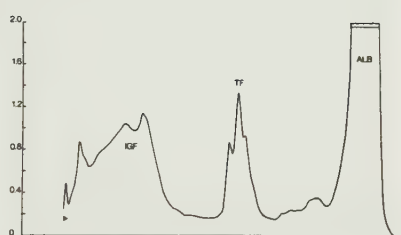
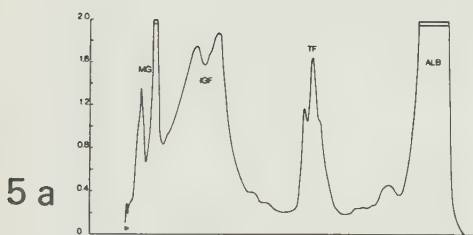


Abb. 6

Immunoelektrophoretische Darstellung der Proteine des Rinderserums und der Follikelflüssigkeit des Rindes. In den vier abgebildeten I.E.-Läufen wurde das Blutserum jeweils oben, die Follikelflüssigkeit jeweils unten aufgetragen; Wanderung des Albumins nach rechts, Wanderung der Immunglobuline nach links.

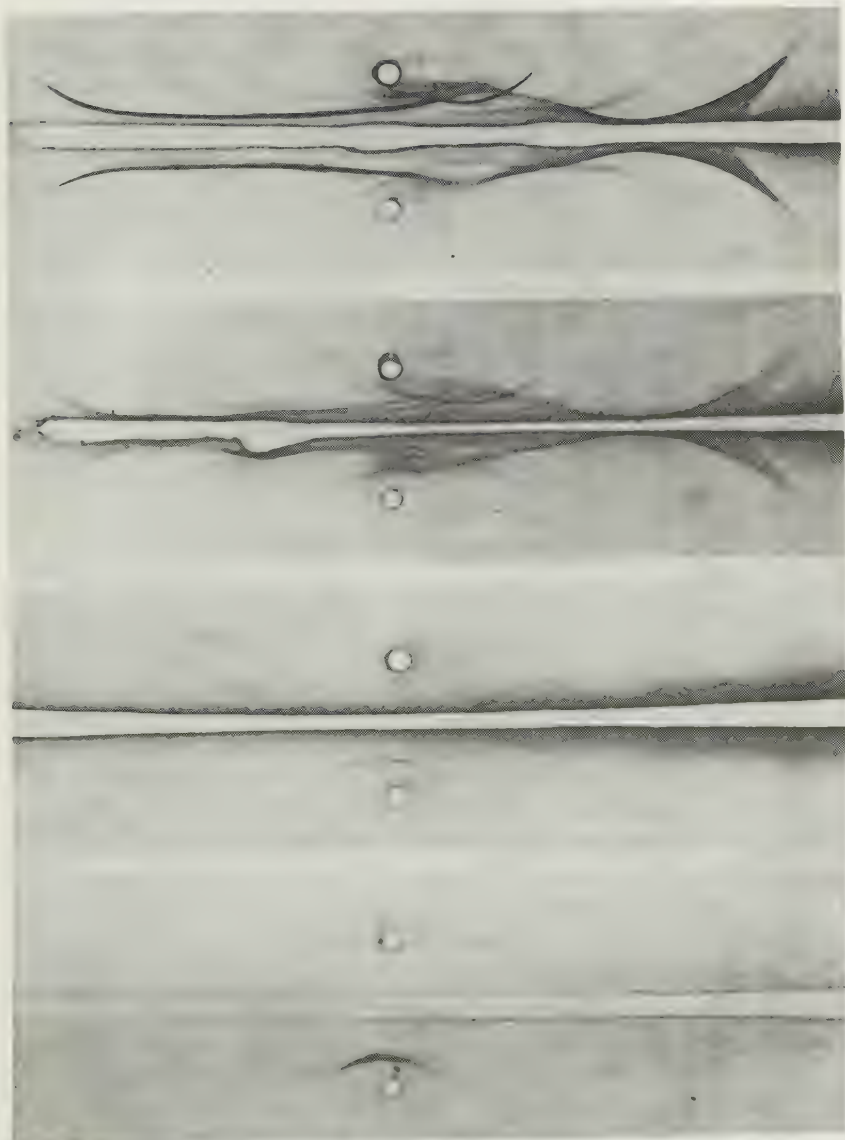
Der Lauf (a) zeigt Präzipitate, die mit Anti-Rinderserum-Serum vom Kaninchen entwickelt wurden, Lauf (b) zeigt Präzipitate, die mit Anti-Rinderfollikelflüssigkeit-Serum vom Kaninchen entstanden. Lauf (c) demonstriert das Präzipitat, welches nach Absorption des Anti-Follikelflüssigkeit-Serums mit Rinderserumproteinen erhalten wurde. Lauf (c) gibt Aufschluß darüber, daß dieses eine Präzipitat mit dem Fibrinogen identisch ist, da die Reaktion der Follikelflüssigkeit mit einem monospezifischen Anti-Rinderfibrinogen-Serum entstand.

6 a

b

c

d



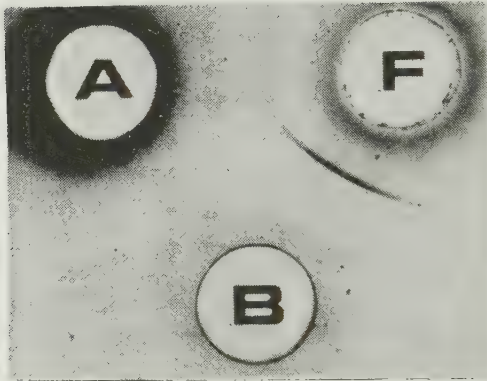


Abb. 7

Duchterlony-Test zur Darstellung des Fibrinogens in der Rinderfollikelflüssigkeit. Die Antigene der Follikelflüssigkeit (F) ergeben mit absorbiertem Anti-Follikelflüssigkeit-Serum (A) und mit dem monospezifischen Anti-Fibrinogen-Serum ein kontinuierliches Präzipitat, welches die Identität des Fibrinogens mit den Präzipitaten aus Abb. 6c und 6d beweist. Die Reaktion des Anti-Fibrinogen-Serums demonstriert, daß neben dem Fibrinogen auch mindestens eines seiner Spaltprodukte in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist: zwischen (F) und (B) sieht man eine zweite, etwas schwach anfärbbare Präzipitatlinie. Da das Spaltprodukt D (MG 83.000) mit den Antikörpern gegen Fibrinogen kreuzreagiert, seltener jedoch das Spaltprodukt E (MG 50.000/25.000), repräsentiert dieses Präzipitat eher das "split product" D.

die Follikelflüssigkeit spezifisches Antigen sein könnte. Allerdings stellte sich bei ausgedehnten Kreuzreaktionsversuchen mit Hilfe des Ouchterlony-Tests heraus, daß dieses Präzipitat dem Fibrinogen entspricht. Mit einem monospezifischen Antiserum gegen Rinderfibrinogen konnte die Identität dieses Präzipitats mit Rinderfibrinogen bewiesen werden (Abb. 6c,d,7). Die immunologischen Studien ergaben bisher keinen Hinweis auf ein in der Rinderfollikelflüssigkeit vorkommendes spezifisches Protein.

3.) Histologische Kontrolluntersuchungen der punktierten Follikel des Schweines

Die punktierten großen, zumeist sprungreifen Follikel wurden histologisch untersucht, um auszuschließen, daß Follikelcysten punktiert wurden. Die großen Tertiär- und Graaf'schen Follikel zeigen den regulären Aufbau mit der Wandschichtung aus Membrana granulosa (avaskulär), Theca interna (vaskularisiert) und Theca externa. Bei vielen Tertiärfollikeln fällt auf, daß die fixierte Follikelflüssigkeit in bemerkenswert unterschiedlicher Weise granuliert, bzw. fadenförmig-vernetzt erscheint (Abb. 8a,b). Es ist naheliegend, bei dieser verschiedenen "Ausfällung" an unterschiedliche Eiweißkonzentrationen zu denken, jedoch ist es wahrscheinlicher, daß der Gehalt an Fibrinogen von Tertiärfollikel zu Tertiärfollikel variiert. Eine Abklärung dieser Frage wäre interessant, hingegen ist sie im Rahmen unserer Fragestellung zunächst nicht vorrangig.

Die Abbildungen 8c-e zeigen, daß nach der Punktion, wie schon bei den Rinderfollikeln demonstriert, die Granulosazellschicht wellenförmig aufgeworfen wird. Die Menge an abgelösten Zellen der Membrana granulosa, die sich unter dem Punktionsunterdruck im Antrum folliculi verteilen und teils mit der Follikelflüssigkeit abgesogen werden, ist größer als beim Rinderfollikel. Die Granulosazellschicht bleibt allerdings überwiegend völlig intakt.

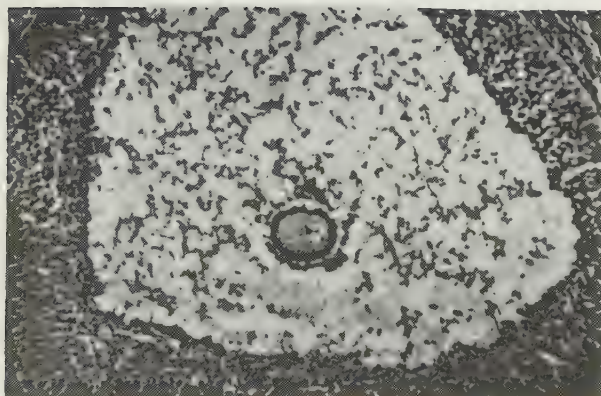
Abb. 8

Histologische Kontrolluntersuchung der punktierten Follikel des Schweines. Die im Schnittbild erfaßten Tertiärfollikel lassen auffällige Unterschiede in der Granulation der ausgefällten Follikelflüssigkeit erkennen (a, b). Die starke, fadenförmig-vernetzt aussehende Ausfällung in Abb. 8a läßt einen erhöhten Fibrinogengehalt vermuten. In diesem Bild wurde die Eizelle des Follikels im Tangentialschnitt mit erfaßt. In anderen Tertiärfollikeln ist praktisch kein ausgefälltes Eiweiß im Antrum folliculi zu erkennen (8b). Vergr. (a, b) $\times 140$.

Die Teilabbildungen (c), (d) und (e) zeigen, daß nach Punktion von sprungreifen Follikeln (c, d) die Wandschichten des druckentlasteten Follikels (e) wellenförmig aufgeworfen werden. Stellenweise lösen sich Zellen der Granulosaschicht ab und werden durch den bei der Punktion erzeugten Unterdruck mit der Follikelflüssigkeit abgesogen. Eine "Verunreinigung" der Analysenproben wurde weitgehend dadurch vermieden, daß alle Punktate vor der Weiterbearbeitung für die proteinanalytischen Tests zentrifugiert wurden, jedoch schließt dies nicht aus, daß Zellproteine in die Punktate gelangen konnten. Die Ergebnisse scheinen hingegen zu bestätigen, daß für die beabsichtigte Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine nennenswerten Kontaminierungen zustandekamen.

Vergr. (c) $\times 140$, (d) $\times 350$, (e) $\times 140$.

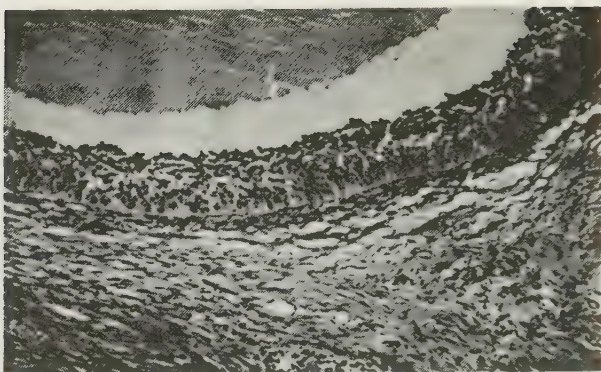
8a



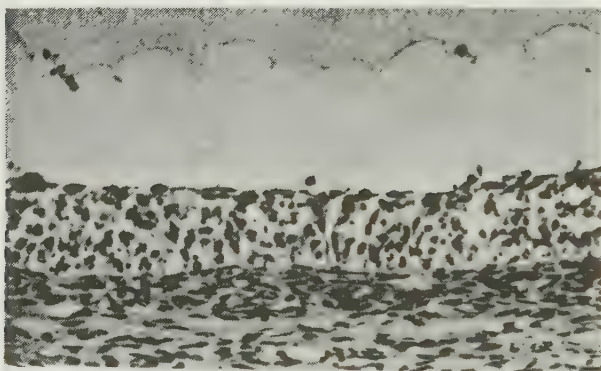
b



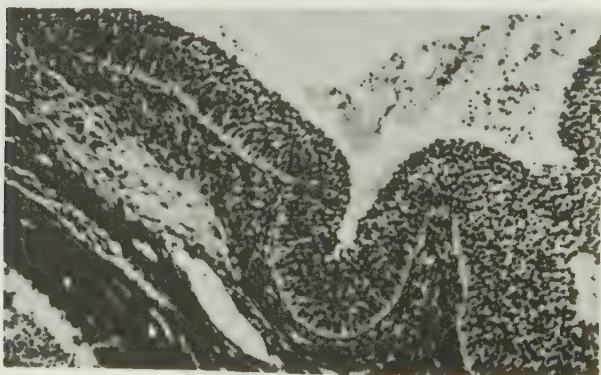
8 c



d



e



4.) Protein-biochemische Untersuchungen des Blutserums und der Follikelflüssigkeit des Schweines

a) Proteingehalt des Blutserums

Bei der Gesamtproteinbestimmung von 9 Schweineblutseren ergaben sich mittels der Mikro-Biuret-Methode Werte zwischen 7,3 g/100 ml und 10,0 g/100 ml. Der Mittelwert errechnete sich zu 8,6 g/100 ml.

b) Elektrophoretische Untersuchungen des Blutserums

Mit der Disk-Elektrophorese lassen sich im Schweineserum 17 bis 21 Proteinbanden nachweisen (Abb. 9). Präalbumine fehlen, die Front der Albuminzone ist weniger scharf als bei anderen Säugerblutseren. Die Albuminfraktion stellt die am stärksten angefärbte Bande dar. Im Bereich der Postalbumine liegen 5 bis 6 Banden, von denen die zweite in manchen Fällen zu fehlen scheint. Die größte Färbungsintensität zeigen die erste und die vierte Postalbuminbande. Im Hämoixinbereich liegt eine gut identifizierbare Bande, die kurz vor dem Transferrinkomplex wandert. Der Transferrinbereich setzt sich aus zwei Banden zusammen, deren zweite die stärkste Farbreaktion zeigt. Im Posttransferrinbereich lassen sich mit wechselnder Sicherheit zwei Banden nachweisen. Der folgende Immunglobulinbereich ist gekennzeichnet durch eine intensive Hintergrundfärbung, aus der sich fünf Banden deutlich isolieren lassen. In der Mitte des Immunglobulinbereiches grenzt sich deutlich die Front der Makroglobuline ab, die zur Auftragstelle hin nur allmählich an Intensität verliert. Kurz vor der Grenze von Sammel- und Trenngel erscheinen noch einmal zwei klar abgrenzbare Proteinbanden. Die Grenze selbst ist durch die im Sammelgel verbleibenden hochmolekularen Proteine intensiv angefärbt.

Bei der PAS-Färbung zeigen sich zwei im Albuminbereich wandernde Proteine, bei denen es sich vermutlich um das Orosomuroid und das α_1 -Antitrypsin handelt. Weiterhin wird deutlich, daß sämtliche im Postalbumin-, Transferrin- und Hämoexinbereich schon mit der Amidoschwarz-Färbung identifizierbaren Proteine einen Kohlenhydratanteil besitzen. Im Immunglobulinbereich tritt die zur Auftragstelle hin unscharf begrenzte Bande der Makroglobuline in den Vordergrund. Auch die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel lassen sich zumindest teilweise mit PAS anfärben.

c) Proteingehalt der Schweine-Follikelflüssigkeit

Bei 14 Schweine-Follikelflüssigkeiten ergab die Analyse des Gesamtproteingehalts Werte zwischen 5,7 und 7,3 g/100 ml. Der arithmetische Mittelwert errechnet sich zu 6,4 g/100 ml.

d) Elektrophoretische Untersuchungen der Follikelflüssigkeit

Das elektrophoretische Bild der Follikelflüssigkeit des Schweines gleicht im Wesentlichen völlig dem des Serums. Auffällig ist, daß bei den Individuen, bei denen sich im Serum 6 Postalbuminbanden identifizieren lassen, auch in der Follikelflüssigkeit 6 Banden in gleicher Anordnung und Farbintensität erscheinen. Der Immunglobulinbereich zeichnet sich durch eine im Vergleich zum Serum wesentlich geringere Hintergrundfärbung aus. Eine Bande der Makroglobuline ist nur in geringer Ausprägung zu finden. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel läßt sich kaum eine Anfärbung feststellen.

Wie die Amidoschwarz-Färbung, bietet auch die PAS-Färbung eine große Ähnlichkeit der beiden Flüssigkeiten Serum und Follikelflüssigkeit. Alle mit Hilfe der Amidoschwarz-Färbung identifizierbaren Postalbumine und Transferrine scheinen einen Kohlenhydratanteil zu besitzen. Auffällig ist weiterhin das fast völlige Fehlen einer gesteigerten Farbintensität im Bereich der

Immunglobuline und an der Grenze vom Sammel- zum Trenngel.

Das Protein mit der zweitschnellsten Beweglichkeit (Abb. 10) tritt bei der Anfärbung mit PAS in der Elektrophorese von Follikelflüssigkeit nur in ganz geringer Intensität in Erscheinung. Bei der densitometrischen Verifizierung dieses Befundes ergab sich, daß die beiden Proteine mit der größten Beweglichkeit im Serum in nahezu gleicher Konzentration vorliegen, dagegen in der Follikelflüssigkeit das zweitschnellste Protein nur in etwa der Hälfte der Konzentration der schnellsten Fraktion vorliegt.

e) Immunologische Analysen der Serum- und Follikelflüssigkeitsproteine des Schweines

Mit den beiden selbst hergestellten Antiseren gegen Schweineserumproteine und gegen Schweinefollikelflüssigkeit werden in der Immunoelktrophorese sehr ähnliche Präzipitatbilder dargestellt (Abb. 11a/b). Allerdings erkennt man bei detailliertem Vergleich der Bilder, daß dieselben Präzipitate wie beim Material vom Rind Besonderheiten aufweisen. Im Serum fehlt ein β_1 -Globulin-Präzipitat, in der Follikelflüssigkeit fehlt das Präzipitat des α_2 -Makroglobulins. Da mir kein spezifisches Antiserum gegen Schweinefibrinogen vorlag, habe ich versucht, die nach Absorption des Anti-Follikelflüssigkeit-Serums mit Schweineserum noch verbleibenden Antikörper als Anti-Fibrinogen-Antikörper zu identifizieren, indem ich Kreuzreaktionen mit Anti-Rinderfibrinogen-Serum analysierte. Wie die Abb. 11d-e zeigt, reagiert das in der Follikelflüssigkeit des Schweines gefundene β_1 -Globulin in der Immunoelktrophorese identisch mit dem Rinderfibrinogen. Auch im Ouchterlony-Test ist diese Reaktion nachweisbar. Die immunologischen Studien ergaben bisher, wie bei der Follikelflüssigkeit des Rindes, daß ein nur in der Schweinefollikelflüssigkeit vorkommendes, spezifisches Protein mit den von uns angewandten immunologischen Methoden nicht nachweisbar ist.

Abb. 9

Proteinmuster vom Blutserum (a,c) und der Follikelflüssigkeit (b,d) des Schweines. Beide Analysenproben stammen jeweils vom selben Tier, um individuelle, genetisch bedingte Schwankungen im Proteinmuster abzugrenzen. Individuelle Schwankungen werden im Postalbuminbereich deutlich.

Die Serum- und Follikelflüssigkeitsproben des ersten Tieres wurden zum Vergleich mit der Gesamtproteinfärbung auch mit der PAS-Reaktion dargestellt (Serum = e, Follikelflüssigkeit = f).

Disk-Elektrophorese, Wanderung der Proteine von links nach rechts, die kräftig gefärbte Bande am rechten Bildrand ist Albumin;
Tris-Glycin-Puffer pH 9.0;
Amidoschwarz-10B-Färbung (a,b,c,d),
PAS-Färbung (e,f).

9 a



b



c



d



e



f

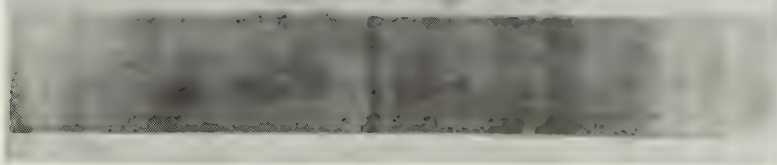


Abb. 10

Elektrophorese-Densitogramme von Schweineserum (a,b,c) und Follikelflüssigkeit (d,e,f). Die abgebildeten Analysenpaare stammen von drei verschiedenen Schweinen (a/d, b/e, c/f). Die Densitogramme zeigen, daß nur geringfügige Unterschiede zwischen Serum und Follikelflüssigkeit nachweisbar sind. Die beiden oberen Reihen (a/d, b/e) sind nach Amidoschwarz-Färbung aufgezeichnet, die untere Reihe (c/f) nach PAS-Färbung.

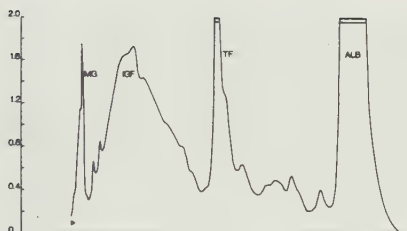
Diak-Elektrophorese, Tris-Glycin-Puffer pH 9.0;

Absorptionen: Amidoschwarz-Färbung 600 nm,

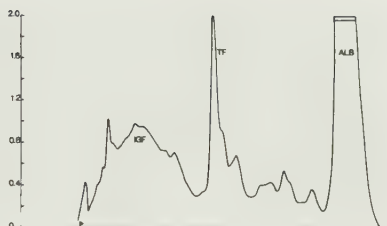
PAS-Färbung 550 nm.

Abkürzungen: ALB Albumin, AZ Albuminzone, IGF Immunglobulinfraktion, MG Makroglobulinzone, TF Transferrinkomplex.

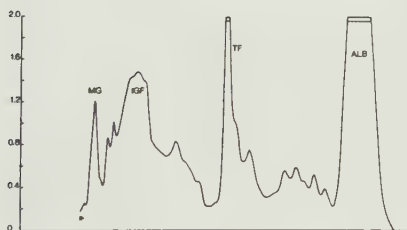
10 a



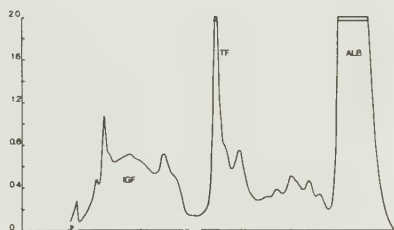
d



b



e



c



f



Abb. 11 a - c

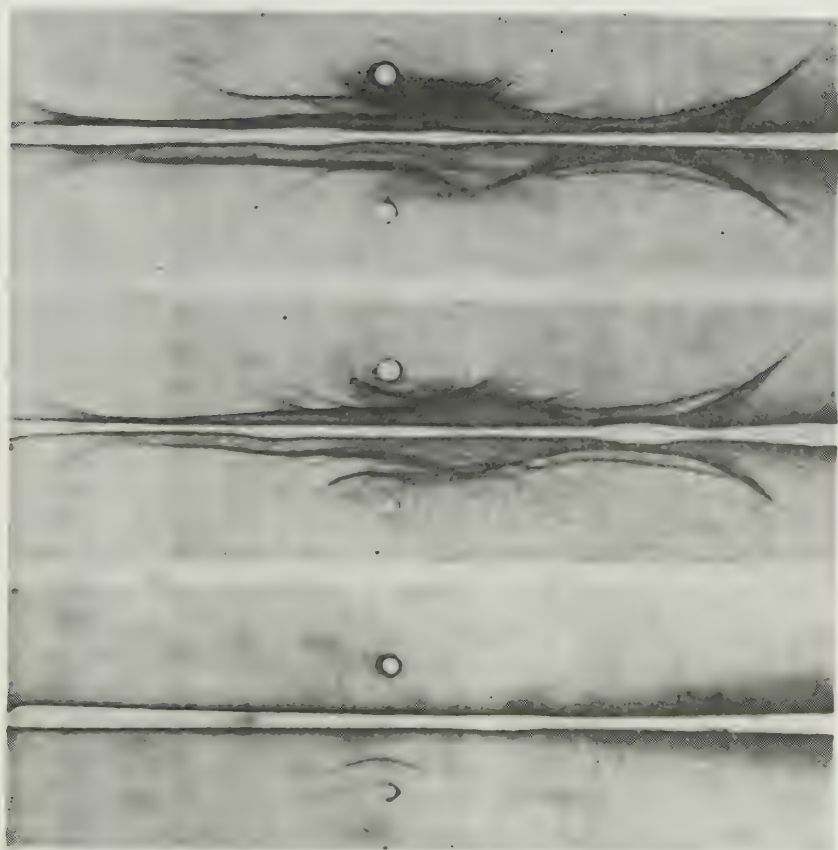
Immunoelktrophoretische Darstellung der Proteine des Schweineserums und der Follikelflüssigkeit des Schweines. In den drei abgebildeten I.E.-Läufen wurde das Blutserum jeweils oben, die Follikelflüssigkeit jeweils unten aufgetragen; Wanderung des Albumin nach rechts, Wanderung der Immunglobuline nach links.

Der Lauf (a) demonstriert Präzipitate, die mit Anti-Schweineserum-Serum vom Kaninchen entwickelt wurden; Lauf (b) zeigt Präzipitate, welche mit Anti-Schweinefollikelflüssigkeit-Serum vom Kaninchen entstanden; Lauf (c) zeigt das Präzipitat, das nach Absorption des Anti-Follikelflüssigkeit-Serums mit Schweineserumproteinen erhalten wurde.

11a

b

c



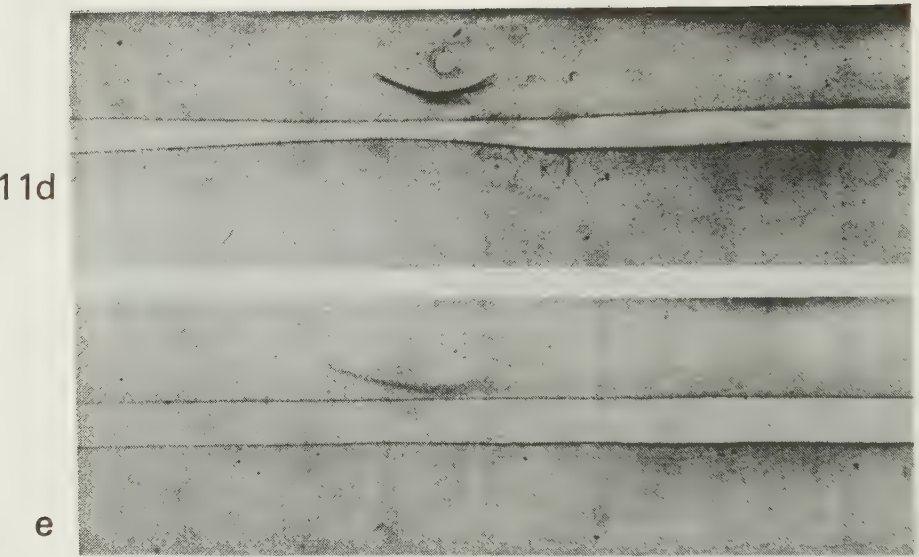


Abb. 11 d,e

Immunoelktrophoretische Darstellung des Fibrinogens aus Rinder- und Schweinefollikelflüssigkeit mit dem monospezifischen Anti-Rinderfibrinogen-Serum vom Kaninchen.

Lauf (d) zeigt die Präzipitation des Fibrinogens der Rinderfollikelflüssigkeit, Lauf (e) demonstriert dieselbe Präzipitatabildung des Fibrinogens der Schweinefollikelflüssigkeit. Bemerkenswert ist die Interspezieskreuzreaktion Rind/Schwein.

5.) Protein-biochemische Untersuchungen des Blutserums
und der Follikelflüssigkeit des Menschen

a) Proteingehalt des Blutserums

Die Blutseren der 4 pelviskopierte Patientinnen wiesen einen Gesamtproteingehalt zwischen 6,9 und 7,3 g/100 ml auf. Der Mittelwert errechnete sich in diesem Fall zu 7,15 %, ein Wert, der im Normbereich der klinisch-chemischen Bestimmungen liegt.

b) Elektrophoretische Untersuchungen des Blutserums

Die Auftrennung des Serums ergibt nach Färbung mit Amidoschwarz 15 bis 17 Proteinbanden. Ein Präalbumin läßt sich als schwache Bande nachweisen, meist vor der breiten Albuminzone liegend oder manchmal auch in dieser eingeschlossen. Die Albuminbande ist dominierend, darauf folgen drei Postalbumine, deren dritte Fraktion am schwächsten anfärbbar ist. Im Hämapexinbereich sieht man nur zwei Banden liegen, eine stärkere und eine schwächere. Der Transferrinkomplex wird aus 3 Banden gebildet, deren mittlere eine besonders starke Anfärbung zeigt. Anschließend an den Transferrinbereich stellen sich zwei Proteinbanden dar, die zu den Haptoglobinen gehören. Daran schließt sich die an ihrer Front relativ scharf begrenzte Immunglobulinfraktion an. In dieser Zone sticht ein hochmolekulares Protein, das α_2 -Makroglobulin, hervor. An der Auftragstelle bleiben weitere hochmolekulare Proteine liegen, die eine kräftig gefärbte Zone ergeben.

Nach PAS-Färbung sieht man in der Regel 11 Banden, die einen deutlichen Kohlenhydratanteil repräsentieren. Das Transferrin und die Makroglobuline zeigen neben dem Präalbumin-Albumin-Peak die stärkste Farbindensität. Deutlich hebt sich auch das Haptoglobin ab, während der Immunglobulinbereich nur eine relativ schwache, diffuse Anfärbung aufweist (Abb. 12e, 13).

c) Proteingehalt der Follikelflüssigkeit
des Menschen

Die 4 Punktate, welche mir an der Kieler Frauenklinik zur Verfügung standen, wurden ausschließlich nach Zusatz von Citrat analysiert. Die Citrat-Volumina sind nicht im erforderlichen Maße exakt konstant gehalten worden, so daß die Gesamtproteinbestimmungen nur einen orientierenden Charakter haben können. Die Bestimmungen ergaben Werte zwischen 1,7 und 2,5 g/100 ml, d.h. einen Mittelwert von 2,1 % Gesamtprotein, bezogen auf das unverdünnte Follikelflüssigkeitspunktat.

d) Elektrophoretische Untersuchungen der Follikel-
flüssigkeit

Die Diskelektrophorese-Trennung der menschlichen Follikelflüssigkeit ergibt ein sehr ähnliches Bild im Vergleich zur Serum-Auftrennung (Abb. 12). Die Proteinbandenzahl und Anfärbung im Bereich des Albumins, der Postalbumine, des Transferrins und des Haptoglobins ist nahezu identisch. Lediglich die Immunglobulin- und Makroglobulinbereiche weisen deutliche Abweichungen auf. Die hochmolekularen Proteine fehlen oder sind auf sehr geringe Konzentrationen beschränkt.

Ebenso, wie nach der Amidoschwarz-Färbung deutlich wird, kommt es auch nach der PAS-Färbung zu fast gleichen elektrophoretischen Proteinmustern von Follikelflüssigkeit und Blutserum. Die kohlenhydratreichen Makroglobuline fehlen auch nach PAS-Färbung in der Follikelflüssigkeit (Abb. 12f).

e) Immunologische Analysen der Serum- und Follikel-
flüssigkeitsproteine des Menschen

Mit Anti-Humanserumprotein-Seren lassen sich in der Immunoelektrophorese von Blutserum und Follikelflüssigkeit sehr ähnliche Präzipitatbilder darstellen (Abb. 14).

Bei günstiger Proteinkonzentration, d.h. bei optimaler Antigenkonzentration, präzipitiert in der Follikelflüssigkeit lediglich das α_2 -Makroglobulin nicht (Abb. 148). Mit monospezifischen Antiseren gegen eine Vielzahl von Humanserumproteinen konnte ich zeigen, daß die meisten Serumproteine auch in der Follikelflüssigkeit vorkommen (Tabelle 1). Allerdings wurde demonstriert, daß das α_2 -Makroglobulin in kleinerer Menge doch in der Follikelflüssigkeit vorkommen kann; jedoch stellte sich heraus, daß keine der untersuchten Proben das hochmolekulare Immunglobulin IgM enthielt. Mit einem so limitierten Material, wie es bisher nur zur Verfügung stand, ist es leider nicht möglich gewesen, eigene Immunisierungen durchzuführen, um die Frage nach einem follikelflüssigkeitsspezifischen Antigen beim Menschen zu beantworten. Entsprechende Analysen und Immunisierungsversuche sind vorgesehen.

Abb. 12

Proteinmuster vom menschlichen Blutserum (a,c) und der Follikelflüssigkeit (b,d) des Menschen. Beide Analysenproben stammen jeweils von denselben Patientinnen, um individuelle, genetisch bedingte Schwankungen im Proteinmuster abzugrenzen. Leichte individuelle Schwankungen werden im Posttransferrinbereich sichtbar.

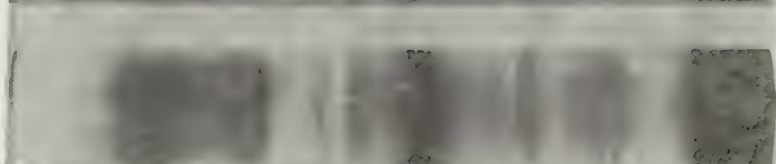
Die Serum- und Follikelflüssigkeitsproben der ersten Patientin wurden zum Vergleich mit der Gesamtproteinfärbung (Amidoschwarz) auch mit der PAS-Reaktion dargestellt (Serum = e, Follikelflüssigkeit = f).

Disk-Elektrophorese; Wanderung der Proteine von links nach rechts, die kräftig gefärbte Bande am rechten Bildrand ist Albumin;
Tris-Glycin-Puffer pH 9.0;
Amidoschwarz-108-Färbung (a,b,c,d),
PAS-Färbung (e,f).

12a



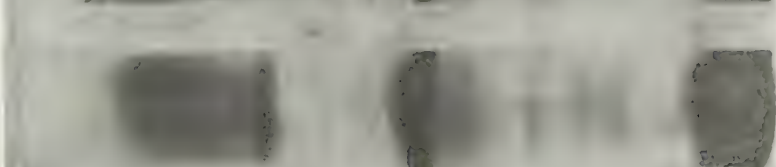
b



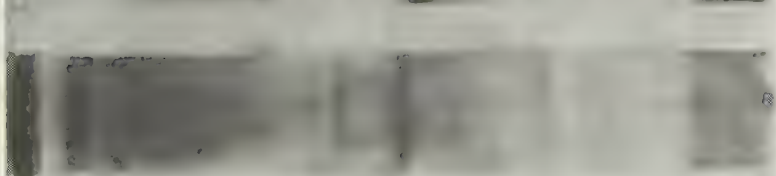
c



d



e



f

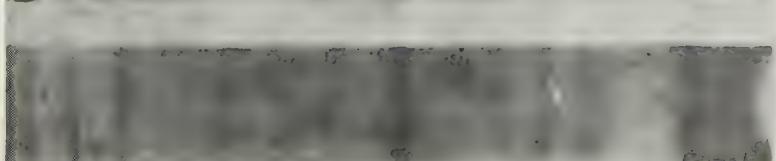


Abb. 13

Elektrophorese-Densitogramme von Serum (a,b,c) und Follikelflüssigkeit (d,e,f) des Menschen. Die abgebildeten Analysepaare stammen von drei verschiedenen Patientinnen (a/d, e/b, c/f). Die beiden oberen Reihen (a/d, e/b) sind nach Amidoschwarz-Färbung aufgezeichnet, die untere Reihe (c/f) nach PAS-Färbung.

Disk-Elektrophorese, Tris-Glycin-Puffer pH 9.0;

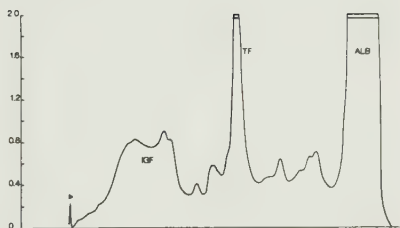
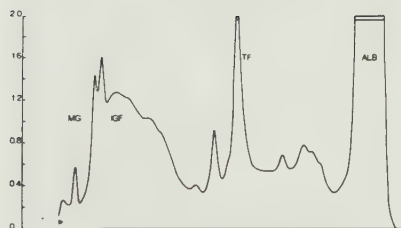
Absorptionen: Amidoschwarz-Färbung 600 mm,

PAS-Färbung 550 mm.

Abkürzungen: ALB Albumin, A/P Albumin-Präalbumin-Komplex,

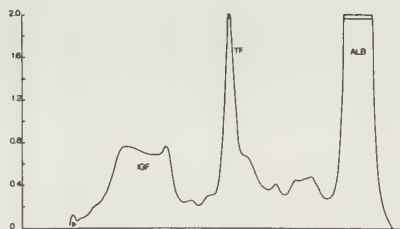
IGF Immunglobulinfraktion, MG Makroglobulinzone, TF Transferrin.

13a



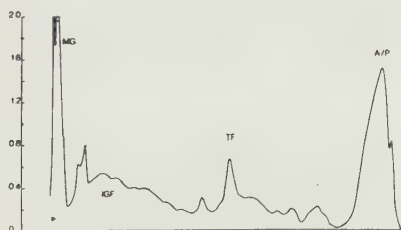
d

b



e

c



f

14a

b

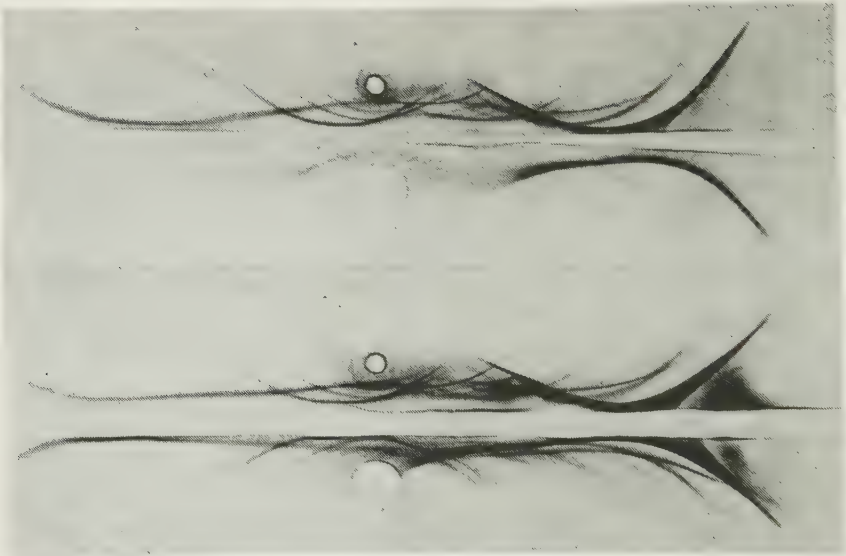


Abb. 14

Immunelektrophoretische Darstellung der Proteine des menschlichen Blutserums und der Follikelflüssigkeit des Menschen mit Anti-Humanserum-Serum vom Kaninchen. Das Albumin wanderte nach rechts, die Immunglobuline nach links.

Lauf (a) zeigt oben das typische Humanserumpräzipitat-Muster, unten die relativ schwachen Präzipitate der Follikelflüssigkeit. Lauf (b) demonstriert ebenfalls oben das charakteristische Humanserumpräzipitat-Muster, unten das Muster der homologen Follikelflüssigkeit. Die erkennbaren Unterschiede beruhen auf verschiedenen Antigenkonzentrationen der Analysenproben.

Tabelle 1

Immunologisch nachgewiesene Proteine in der Follikel-
flüssigkeit des Menschen

Protein	Molekular- gewicht	Serum	Follikel- flüssigkeit
Präalbumin	50.000	+	+
Albumin	65.000	+	+
Orosomucoid	44.000	+	+
α_1 -Antitrypsin	54.000	+	+
Coeruloplasmin	132.000	+	+
Transferrin	80.000	+	+
Lactoferrin	80.000	+	0
Haptoglobin	100.000	+	+
α_2 -Makroglobulin	820.000	+	+
IgG	150.000	+	+
IgA	160.000	+	+
IgM	900.000	+	0

IV. Diskussion

1.) Entstehung der Follikelflüssigkeit

Wachstum und Reifung eines Säugetierfollikels gehen stets mit der Ansammlung und Vermehrung von Follikelflüssigkeit im Antrum folliculi einher. Im Stadium der Sekundärfollikel sieht man verbreiterte Interzellularspalten, die offensichtlich ein Sekret des Follikel­epithels, d.h. der Granulosazellen enthalten. Diese Flüssigkeitsansammlungen wurden auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen, und ihre Herkunft aus den Granulosazellen wird von HADEK (1963) diskutiert. Im Innern des Follikels bildet sich der Liquor-folliculi-Raum. Die Eizelle jedes Follikels liegt exzentrisch der Granulosawand an, leicht fixiert durch die Zellen des Cumulus oophorus.

Die Vergrößerung der Follikel wird praktisch immer durch Volumenzunahme der Follikelflüssigkeit verursacht. Diese Flüssigkeitsvermehrung ist während der präovulatorischen Wachstumsphase des Follikels am größten. Die Bildungsweise des Liquor folliculi ist zwar noch nicht völlig geklärt, jedoch ist es wahrscheinlich, daß sowohl eine aktive Sekretionsleistung der Granulosazellen, als auch eine Transsudation aus dem Blutplasma gemeinsam den Liquor folliculi bilden. Die gefäßlose Schicht der Membrana granulosa und die Basalmembran bilden eine bemerkenswert stark ausgeprägte Barriere zum Blutkreislauf, jedoch scheint die Transsudation über Interzellularspalten und wohl auch über Cytopempsis-Mechanismen sehr gut zu funktionieren.

Die relativen Anteile von Granulosasekretion und Plasmatranssudation sind im Verlaufe der Follikelentwicklung quantitativ sehr unterschiedlich. Wie radioautographische Studien von BÜSTRÖM und ODEBLAD (1952), sowie ODEBLAD (1954) zeigen, beginnt die Follikelflüssigkeitsansammlung in den frühen Stadien der Tertiärfollikel mit einer aktiven Sekretion der Granulosazellen. Radioaktiv markierter Schwefel (S^{35}) erscheint nach systemischer Injektion zuerst in

den Follikelzellen, dann im Liquor folliculi. Erst mit der durch spezifische Gonadotropinstimulierung ausgelösten Wachstumsphase vom Tertiär- zum Graaf'schen Follikel setzt offenbar eine starke Transsudation ein, die zu diesem Zeitpunkt ausschließlich als Quelle der enormen Flüssigkeitsvermehrung anzusehen ist.

Aber nicht nur das Flüssigkeitsvolumen wird durch die Plasma-transsudation entscheidend beeinflusst, auch der Proteingehalt der Follikelflüssigkeit spiegelt den Einstrom von Plasmakomponenten wieder. Die vorliegende Arbeit über die Proteinmuster der Follikelflüssigkeit beweist, daß sich die Proteinausstattung der Flüssigkeit sprungreifer Follikel von den Blutplasma-proteinen herleitet. Wie ich mit der hochempfindlichen Disk-elektrophorese und mit immunologischen Methoden zeigen konnte, wird der Prozeß der Transsudation kleiner Proteinmoleküle von einer Selektion hochmolekularer Eiweiße begleitet.

2.) Proteinmuster der Follikelflüssigkeit

Frühere Untersuchungen über das Proteinmilieu der Follikelflüssigkeit wurden mit weniger empfindlichen Methoden und ohne kombinierte immunologische Analysen durchgeführt. Sowohl beim Schwein (SHIVERS et al. 1964 ; McGAUGHEY and DANIEL, 1972), als auch beim Rind (LUTWAK-MANN, 1954; OLDS and VANDEMARK, 1954 ; CARAVAGLIOS and CILOTTI, 1957 ; DESJARDINS et al. 1966), schließlich auch beim Menschen (SHALGI, KRAICER and SOFERMAN, 1972) konnten mit Papier- und Zelluloseacetat-Elektrophorese weitreichende Ähnlichkeiten zwischen Follikelflüssigkeit und Blutserum der entsprechenden Arten festgestellt werden. Die vereinzelt Anwendung der Polyacrylamid-Elektrophorese und auch der Immunoelktrophorese führte offensichtlich zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die meisten Untersucher fahndeten nach spezifischen Proteinen, die sich in anderen Körperflüssigkeiten nicht nachweisen lassen.

DESJARDINS *et al.* stellte mit immunoelektrophoretischen Analysen ein Präzipitat in der Follikelflüssigkeit des Rindes dar, bei dem es sich wahrscheinlich um das Fibrinogen handelt. Zum gleichen Ergebnis kommen SHIVERS und Mitarbeiter. Es ist allerdings bedeutsam, darauf hinzuweisen, daß diese Untersucher nicht auf die sorgfältige Überstimmung der individuellen Follikelflüssigkeits- und Serum-"Quelle" achteten, d.h. es stammten die Proben für den direkten Vergleich meistens nicht vom selben Tier.

Die auffälligsten Unterschiede im Proteinmuster der Follikelflüssigkeit und des Blutserums fanden SHIVERS *et al.* (1964) im Bereich der β -Lipoproteine. Diese hochmolekularen Proteine (MG $\sim$ 2.000.000) sind offensichtlich nicht in der Lage, aus dem Serum in die Follikelflüssigkeit zu transsudieren. Auch SHALGI *et al.* (1972) fanden in der menschlichen Follikelflüssigkeit kein β -Lipoprotein. Beim Vergleich von Proteinmustern der Flüssigkeiten sog. "kleiner" und "großer" Follikel und der Serumproteine berichten McGAUGHEY und DANIEL (1972), daß im Postalbuminbereich (Acrylamid-Elektrophorese) in der Flüssigkeit "kleiner" Follikel eine Proteinbande nachweisbar sei, die in der Flüssigkeit "großer" Follikel und im Serum nicht vorkomme. Darüber hinaus sei im Postalbuminbereich in der Flüssigkeit "großer" Follikel eine Proteinbande nachweisbar, die weder in der Flüssigkeit "kleiner" Follikel, noch im Blutserum aufzufinden sei. Wenn wir die Definition dieser Autoren interpretieren, daß unter "kleinen" Follikeln Tertiärfollikel und unter "großen" Follikeln sprungreife (GRAAF'sche) Follikel zu verstehen sind, können wir diesen Befund nicht bestätigen. Ich habe mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden in entsprechenden Follikelflüssigkeiten und im Blutserum des Schweines jeweils bei Verwendung von Material desselben Tieres keine Unterschiede im Postalbuminbereich finden können. Auch einen Unterschied hinsichtlich der Postalbuminbanden im Proteinmuster von Tertiär- und GRAAF'schen Follikeln konnte ich nicht feststellen.

Vergleicht man jedoch die Disk-Elektrophorese-Trennungen von Serum und Follikelflüssigkeit zweier verschiedener Individuen, z.B. in Abb. 9 die Proteinmuster (a) und (d) oder (b) und (c),

so ist leicht einzusehen, warum McGAUGHEY und DANIEL (1972), als auch McGAUGHEY (1975) unter Verwendung eines einzigen, gepoolten (!) Serum-Standards zu der Auffassung gelangen, es könne im Postalbuminbereich "spezifische" Follikelflüssigkeitsproteine geben. Nicht nur die Amidoschwarz-Färbung in der Abb. 9 (a-d), sondern auch die PAS-Färbung (e-f) beweist zweifelsfrei, daß ein Vergleich von Serumproteinmuster und Follikelflüssigkeit nur dann zu einem verlässlichen Ergebnis führt, wenn individuell identische Proben eingesetzt werden. Beim Schwein scheinen besonders im Postalbuminbereich genetisch unterschiedliche Proteinmuster vorzuliegen, die von allen früheren Untersuchern der Follikelflüssigkeit unbeachtet blieben.

Auf der Suche nach einem follikelflüssigkeitsspezifischen Protein, dem zentralen Anliegen dieser Studie, kam eine klare Antwort zustande. Mit allen angewandten Methoden, die z.Zt. als besonders empfindlich eingestuft werden dürfen (Disk-Elektrophorese, Immunelektrophorese, Immunodiffusionstest), ist ein solches Protein in der Follikelflüssigkeit vom Rind, Schwein und vom Menschen nicht nachweisbar. Wie die immunologischen Analysen zeigen, handelt es sich bei dem einzigen, klar präzipitierbaren Antigen, das nach Absorption des Anti-Follikelflüssigkeitserums mit Blutserum darstellbar ist, um das Fibrinogen. Mit dem Ouchterlony-Test (vgl. Abb. 7) konnte darüber hinaus ein Spaltprodukt des Fibrinogens in der Follikelflüssigkeit des Rindes nachgewiesen werden ("split product" D). Die Anti-Fibrinogen-Antikörper reagieren in der Regel auch mit dem Spaltprodukt D (MG 83.000), jedoch nicht mit dem Spaltprodukt E (MG 50.000 als Dimer oder 25.000 als Monomer). Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß Fibrinogen und seine Spaltprodukte D und E sowohl die Basalmembran zwischen Theca interna und Membrana granulosa ungehindert passieren, als auch die Basalmembran der Theca-interna-Kapillaren leichter durchdringen können als die meisten anderen im Organismus vorkommenden Basalmembranen.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen, daß ein follikelflüssigkeit-spezifisches Protein nicht nachweisbar ist, stimmt mit früheren Befunden von MANARANG-PANGAN und MENGE (1971), sowie BECK und SHELDON (1972) überein; es bestätigt hingegen nicht die Postulate von McGAUGHEY und DANIEL (1972), sowie McGAUGHEY (1975) nach spezifischen Proteinbanden im Postalbuminbereich der Follikelflüssigkeit des Schweines.

In der Follikelflüssigkeit des Menschen konnte ich mit monospezifischen Antiseren gegen Lactoferrin und gegen IgM die entsprechenden Antigene nicht nachweisen. Lactoferrin hat ein relativ niedriges Molekulargewicht, könnte insofern ungehindert die Basalmembranen durchdringen. Es ist jedoch im Serum nicht enthalten, sondern als typisches Sekretprotein Bestandteil vieler sezernierter Körperflüssigkeiten, z.B. im Uterussektret. Lactoferrin wird demnach nicht von den Granulosazellen sezerniert, ja, wir können aufgrund dieses Befundes vermuten, daß eine Proteinsekretion der Granulosazellen im sprungreifen Follikel nicht erfolgt. Das Fehlen von IgM in der menschlichen Follikelflüssigkeit zeigt, daß die Molekularsiebbarriere für Plasmaproteine im Molekulargewichtsbereich von 850.000 liegt. Vereinzelt positive Befunde von IgM in der menschlichen Follikelflüssigkeit wurden von JOHNSON (1973) und EDWARDS (1974) beschrieben, jedoch konnte ich bei den in dieser Arbeit analysierten Proben einen positiven Befund nicht erheben.

3.) Proteinkonzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit vom Rind, Schwein und Menschen (quantitative Unterschiede)

Die mit Hilfe der Mikro-Biuret Methode (GOA, 1953) durchgeführten Messungen des Gesamtproteingehaltes von Serum und Follikelflüssigkeit ergeben für Rinder- und Schweinematerial ebenso wie für menschliches Material wesentlich niedrige Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit als im Serum. So enthält die Follikelflüssigkeit vom Schwein rund 25 ‰, die vom Rind etwa 30 ‰ und die vom Menschen sogar

Über 50 % weniger Protein als das Serum der jeweiligen Spezies. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von McGAUGHEY und DANIEL (1972), die bei "kleinen" Follikeln höhere Proteinkonzentrationen feststellten als in "größeren", kann ich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Follikelgröße feststellen.

Meine Ergebnisse bestätigen diejenigen von LUTWAK - MANN (1954), CARAVAGLIOS und CILOTTI (1957), SHIVERS und METZ (1963) und DESJAR-DINS et al. (1966). Während bei der Untersuchung menschlichen Materials MANARAG-PANGAN und MENGE (1971) in der Follikelflüssigkeit rund 50 % weniger Protein fanden als im Serum, berichten SHALGI et al. (1972) von nahezu gleichen Proteinkonzentrationen in Follikelflüssigkeit und Serum. Die leicht differierenden Absolutwerte der Proteinkonzentrationen können von methodischen Schwierigkeiten bei der Materialgewinnung abhängen. Dennoch ist insgesamt klar ersichtlich, daß bei den von mir untersuchten Arten die Proteinkonzentrationen der Follikelflüssigkeit deutlich unter denen des Serums liegen.

Hinweise auf ein vermehrtes Vorkommen von Albumin in der Follikelflüssigkeit sind bei CARAVAGLIOS und CILOTTI (1957) und bei SHALGI et al. (1972) zu finden. Im Gegensatz dazu ermittelten JENSEN und ZACHARIAE (1958) durch papierelektrophoretische Untersuchungen in der Follikelflüssigkeit des Rindes niedrigere Albumin- und nahezu gleiche Immunglobulinkonzentrationen wie im Serum. Nach unseren Erfahrungen können diese Befunde nur auf die geringe Meßgenauigkeit der densitometrischen Auswertung der Papierelektrophorese oder auf eine Verunreinigung des Materials durch Plasmaproteine zurückzuführen sein.

Wie die Tabelle 2 (A, B, C) zeigt, finden sich bei allen drei von mir analysierten Arten höhere Albuminwerte in der Follikelflüssigkeit als im Serum. Die Werte dieser Tabellen stellen die Mittelwerte von quantitativ-densitometrischen Bestimmungen dar, jeweils als relative prozentuale Anteile am Gesamtproteingehalt. Es wurden von jeder Art 2 charakteristische, individuelle Blut-

Tabelle 2

(A) Quantitative Auswertung (rel. %): Rind (2 Tiere)

	ALB	PA	TR	PTR/IGF/MG
SE	42.6	10.9	10.5	36.0
FF	48.3	13.1	10.6	28.0
SE	38.2	14.2	11.0	36.6
FF	46.6	16.9	12.0	26.5

(B) Quantitative Auswertung (rel. %): Schwein (2 Tiere)

	ALB	PA	TR	PTR/IGF/MG
SE	46.6	4.2	9.8	39.4
FF	55.7	4.5	10.0	29.8
SE	46.9	8.2	9.5	35.4
FF	56.1	8.5	11.0	24.4

(C) Quantitative Auswertung (rel. %): Mensch (2 Patientinnen)

	ALB	PA	TR	PTR/IGF/MG
SE	51.3	10.5	8.7	29.5
FF	62.3	10.3	9.3	18.1
SE	54.4	10.9	7.2	27.5
FF	62.4	10.9	8.9	17.8

Die hier diskutierten Auswertungen der densitometrisch erfaßten Proteinfraktionen stellen jeweils charakteristische Beispiele unseres Materials dar. Statistische Berechnungen sind im Rahmen dieser Arbeit wegen der zahlenmäßig zu geringen Materialmenge nicht angezeigt. SE Serum, FF Follikelflüssigkeit, ALB Albumin, PA Postalbumin, TR Transferrin, PTR Posttransferrin, IGF Immunglobuline, MG Makroglobuline.

und Follikelflüssigkeit-Proben ausgemessen. So wie die quantitativen Proportionen der Albuminfraktionen sich relativ deutlich unterscheiden, sind in umgekehrter Weise unterschiedliche relative prozentuale Anteile im Bereich der hochmolekularen Proteine zu verzeichnen (PTR, IGF, MG). Bei allen untersuchten Arten liegen diese Proteinwerte in der Follikelflüssigkeit niedriger als im Serum. Die quantitativen Relativwerte für die Postalbumin- und die Transferrinfraktionen sind jeweils bei allen Spezies ungefähr gleich groß.

Individuelle Unterschiede finden sich bei Rindern und Schweinen häufiger im Bereich des Transferrinkomplexes. Allerdings erweist sich stets die qualitative Ausbildung der Transferrinfraktion (= Anzahl der Banden) und die quantitative Ausprägung (= relativer prozentualer Anteil am Gesamtproteingehalt) in der Follikelflüssigkeit und im Blutserum desselben Tieres als identisch. Es handelt sich bei dieser Erscheinung um einen genetisch bedingten Proteinpolyorphismus (SCHULTZE and HEREMANS, 1966). Um abzuklären, ob eventuell Hämoglobinverunreinigungen eine oder mehrere Transferrinbanden vortäuschen könnten, habe ich vergleichsweise normales Blutserum mit hämolytischem Serum elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 4). Das Ergebnis jener Trennung zeigt, daß das Hämoglobin zwar in unmittelbarer Nähe zum Transferrinkomplex wandert, aufgrund seines höheren R_F -Wertes jedoch nicht in der Lage ist, einen Transferrinpolyorphismus vorzutäuschen. Der echte Transferrinpolyorphismus ist beim Rind am deutlichsten ausgeprägt, beim Schwein ist er schwächer, dagegen beim Menschen praktisch gar nicht nachweisbar.

Mit Hilfe der PAS-Färbung läßt sich zeigen, daß auch quantitative Unterschiede im Anteil der kohlenhydratreichen Glycoproteine Orosomucoid und α_1 -Antitrypsin bei Serum und Follikelflüssigkeit bestehen. Die Bewertung von quantitativen Unterschieden von Einzelproteinen bedarf allerdings noch wesentlich genauerer Untersuchungen mit verfeinerten Nachweismethoden, um bessere Aussagen und Schlußfolgerungen zu erzielen.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Follikelflüssigkeit der untersuchten Säugerarten und des Menschen ein Transsudat des Blutplasmas darstellt. Die meisten Komponenten des Blutplasmas stehen im Equilibrium mit entsprechenden Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit. Eine durch das Molekulargewicht terminierte Selektion findet lediglich im Bereich sehr großer Moleküle statt. Die Ausschlußgrenze scheint zwischen MG 850.000 und MG 900.000 zu liegen. Die Follikelflüssigkeit kann daher für alle "kleinen" Moleküle, die im Kreislauf zirkulieren, zugänglich sein. Dies ist eine außergewöhnliche Situation für den weiblichen Genitaltrakt, denn weder im Eileiter, noch im Uterus steht die Eizelle, bzw. das embryonale System in einem vergleichbar engen Kontakt mit dem mütterlichen Blut. Sowohl die Tubenflüssigkeit, als auch das Uterussekret setzen sich aus Komponenten zusammen, die ihren Ursprung einerseits in der Sekretion der entsprechenden Mucosa, andererseits in einer selektiven Transsudation aus dem Blutplasma haben (BEIER, 1968, 1974, 1976; BEIER, PETRY and KÜHNEL, 1970). Während in Tube und Uterus lediglich einige wenige Blutplasmaproteine von recht unterschiedlicher Molekülgröße die Sekret-Blutplasma-Barriere passieren, strömen die Blutplasmaproteine bis zum MG 850.000 direkt in die Follikelflüssigkeit ein. Dieses Phänomen hat weitreichende pharmakologische Konsequenzen, denn die heranwachsende und ovulationsreife Eizelle ist auf diese Weise über den humoralen Weg des Blutes für alle Arzneimittel und Antikörper erreichbar. Besonders können bei dieser Passage solche Pharmaka in die Follikelflüssigkeit gelangen, die an Plasmaproteine (z.B. Albumin) als Carrier gebunden sind.

Nach MANCINI et al. (1961, 1962, 1963) soll die Permeabilität der Follikel-Blut-Barriere während der Follikelreifung nicht gleichbleibend konstant bleiben, sondern zur Ovulation hin zunehmen. BJERSING und CAJANDER (1974) stellten bei ausgedehnten Studien der Ovulation des Kaninchens bemerkenswerte ultrastrukturelle Veränderungen der Follikel-Blut-Barriere fest,

die ungefähr 4 Stunden vor der Follikelruptur auftreten. Die Zellverbindungen der Granulosazellen lösen sich, und in der Basalmembran treten elektronenmikroskopisch deutliche Löcher auf, durch die basale Zellprotrusionen der Granulosazellen hindurchtreten. Es ist denkbar, daß auch bei den von mir untersuchten Arten ähnliche Veränderungen vorkommen. Diese Änderung der "Siebporengrößen" der Follikel-Blut-Barriere wenige Stunden vor der Follikelruptur könnte eine Erklärung für unterschiedliche Analysenergebnisse liefern, da in den meisten Fällen die untersuchten Schweine- und Rinderfollikel auf den Zeitpunkt ihrer möglichen Ruptur (= Ovulation) hin nicht analysiert werden konnten, weil die Zyklusanamnese des Tieres unbekannt war.

CRAN, MCORE und HAY (1975) zeigten mit elektronendichten Makromolekülen, daß die Molekulargewichtsgrenze der Permeabilität der Blut-Follikel-Barriere auch mit blutplasmafremden Substanzen in der zuvor genannten Größenordnung liegt. Ferritin (MG 500.000) und kolloidales Gold (MG 1.000.000) wurden in die Ovarialarterien von nichtträchtigen Schafen infundiert. Nur Ferritin erreicht die Granulosazellen, während das kolloidale Gold lediglich in der Theca interna darstellbar bleibt.

4.) Die physiologischen Funktionen der Follikelflüssigkeit

Die Bedeutung der Follikelflüssigkeit besteht nicht allein aus nutritiven und regulativen Partialfunktionen für die Reifung der Eizelle. Aus einer Fülle von Untersuchungen, die von RONDELL (1970, 1974), BAHR et al. (1974), ESPEY (1974) sowie EDWARDS (1974) zusammengestellt wurden, geht hervor, daß von Komponenten der Follikelflüssigkeit auch Einflüsse auf die Auslösung der Ovulation, sowie auf Reaktionen der Eizelle und der Spermien (Capacitation und Befruchtung) erfolgen.

GLASS (1971) studierte mit autoradiographischen Methoden den Transport und die Speicherung von Serumproteinen im Follikel-epithel und Eizelle. Radioaktiv markiertes Albumin und einige andere Proteine (vor allen α -Globuline) lassen sich kurz Zeit nach Injektion in den Kreislauf autoradiographisch in Cytoplasma der Eizelle nachweisen. GLASS diskutiert die Bedeutung dieses Serumproteinpassage sowohl unter nutritiven Aspekt (Proteinreservoir für neue Proteinsynthesen), als auch genetischer Gesichtspunkten (Hemmung und "Maskierung" genetisch wichtiger Komponenten).

Eine große Zahl verschiedener Enzyme wurde beschrieben, die in Follikelflüssigkeit und Follikel-epithelzellen vorhanden sein soll (s. Zusammenfassung bei EDWARDS, 1971). Keine dieser Enzyme erreicht jedoch Konzentrationen, die zu einer klaren Identifizierung in der Disk-Elektrophorese ausreichten würden. Besondere Aufmerksamkeit wurde allerdings auf folgende Enzyme, bzw. Enzymtypen, gelenkt: Proteinasen (PETRY, 1943), Hyaluronidase (ZACHARIAS and JENSEN, 1957), Endonucleasen (JUNG, 1960) sowie Kollagenasen (PETRY, 1943, 1949; RUSSELL, 1970). Die älteren Untersuchungen der Ovulation läßen zunächst vermuten, daß lediglich der proovulatorische Druckenstieg im Follikel zur Runtur führe. Diese rein mechanistische Vorstellung des Follikelsprunges wurde von PETRY (1949) korrigiert. PETRY postuliert eine Veränderung des inneren Gefüges der Bindegewebsfasern der Follikelkuppe durch die in der Follikelflüssigkeit vorkommenden Proteinasen und eine damit verbundene Hydrolytierung der Längsfasern der kollagenen Fibrillen. Neben den durch Flüssigkeitszunahme bedingten Druckenstieg werden enzymatische, nervöse und hormonelle Faktoren als wichtige und unmittelbare Auslöser der Ovulation beschrieben und diskutiert (PETRY, 1949). ESPRY (1971) fand in den Fibrionen der Theca interna von sprudelnden Kaninchenfollikeln multifunktionale Körnchen, die sich von diesen Zellen abschürren und offenbar gleich einen Stoff in die Interzellularräume abgeben. ESPRY nimmt an, diesen Stoff sei das oft postulierten "Ovulations-Innen", möglicherweise eine Kollagenase. In einer jüngeren Arbeit von EDWARDS (1971) wurden Granula in den Oberflächenepithelzellen des Follikelsprunges beschrieben, die eine

auffällige Dynamik im Zusammenhang mit dem Apex folliculi kurz vor der Ovulation zeigen. Es wird diskutiert, daß diese cytoplasmatischen Granule an einer Auflösung der ausgedünnten Bindegewebelemente beteiligt sind, welche beim sprungreifen Follikel das Antrum folliculi im Bereich des Apex (Stigma) vom Oberflächenepithel des Ovariums trennen und ungefähr 1 Stunde vor der Follikelruntur aufgelöst werden. Die beschriebenen Granula verschwinden aus den Epithelzellen zum selben Zeitpunkt.

Flüssigkeitsinjektionen in den sprungreifen Follikel führen nicht zwangsläufig zur Ovulation, jedoch konnten JONES und MALBANDOV (1972) zeigen, daß mit einer sehr kleinen Menge Luteinisierungshormon (ca. 10 ng/Follikel) eine Ovulation beim Kaninchen und der Ratte mit Sicherheit auszulösen ist, wenn diese LH-Injektion direkt in den Follikel erfolgt.

In der Follikelflüssigkeit aller bisher untersuchten Arten (Laboratoriumssäuger, größere Haustiere, etc.) wurden Gonadotropine und Steroidhormone nachgewiesen. Die Steroide werden von den Follikelzellen in die Flüssigkeit sezerniert, sowohl in freier, als auch in konjugierter Form. Die bei unterschiedlichen Arten analysierten Steroidkonzentrationen (besonders für 17β -Oestradiol) sind abhängig von der Follikelgröße und vom Zyklusstadium. Die Konzentrationen einiger Steroide erreichen außerordentlich hohe Werte (vgl. Zusammenstellung von EDWARDS, 1974). Es wird vermutet, daß die Steroidhormone, sowohl in freier, als auch in proteingebundener Form in der Follikelflüssigkeit ein Depot für die sofortige Bereitstellung während der Ovulation und unmittelbar nach dem Eindringen der Eizelle in den Eileiter darstellen. Ein lokaler Steroideinfluß auf die Reifung der Eizelle ist denkbar, zusätzlich wäre auf diese Weise eine Beeinflussung aller Vorgänge vor und während der Befruchtung durch Vermittlung der Komponenten der Follikelflüssigkeit gegeben.

Die Rolle der Proteine, vor allem der Blutplasmaeiproteine, die das Proteinmuster der Follikelflüssigkeit beherrschen, ist unklar. Wir können annehmen, daß ihnen eine besondere Transportfunktion für Hormone, Nährstoffe und Metaboliten zukommt, jedoch bleibt es künftigen Untersuchungen vorbehalten, Antworten auf die vielen Fragen zu liefern, welche sich aus der vorliegenden vergleichenden Studie an den Proteinnustern der Follikelflüssigkeit dreier Arten ergeben. Besondere Beachtung verdient der Aspekt der Evolution. Es scheint nicht sinnlos zu sein, bei weiteren Einzelanalysen auch niedriger entwickelte Vertebraten als Säugetiere zu berücksichtigen. Gibt es doch z.B. Fische, wie u.a. Hemirhamphidae und Poeciliidae, die ihre gesamte Ontogenese im Follikel absolvieren, wo auch die Eizelle heranreift. Die "Ovulation" dieser Fische ist gleichzeitig die "Geburt". Vergleichende Analysen der Follikelflüssigkeitsproteine bei anderen als Säugetierarten könnten interessante neue Erkenntnisse bringen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit biochemischen und immunologischen Methoden das Proteilmuster der Follikelflüssigkeit dreier Arten analysiert: Mensch, Rind und Schwein. Die zu untersuchenden Follikelflüssigkeiten wurden durch Punktion sprungreifer Follikel gewonnen. Zum Vergleich der Proteilmuster wurde Blutserum derselben Individuen herangezogen, um genetisch bedingte Proteilmustervarianten zu erkennen und zu berücksichtigen. Der Funktionszustand der Follikel ist jeweils mittels histologischer Kontrollanalysen überprüft worden. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1.) Die disk-elektrophoretischen Proteilmuster von Serum und Follikelflüssigkeit sind einander außerordentlich ähnlich. Qualitative Unterschiede sind nur im Makroglobulinbereich erkennbar. Quantitative Verschiebungen der rel.prozentualen Anteile der Proteinfractionen sind um so deutlicher, je größer das Molekulargewicht der entsprechenden Proteine ist. Der Gesamtproteingehalt der Follikelflüssigkeit liegt unter dem Proteingehalt des Blutserums (beim Schwein um ca 25 %, beim Rind um ca. 30 %, beim Menschen um ca. 50 %).
- 2.) Mit den empfindlichen Analysen der Disk-Elektrophorese, Immunelektrophorese und Immunodiffusionstests ist in keiner der drei untersuchten Arten ein für die Follikelflüssigkeit spezifisches Protein nachzuweisen. Durch aktive Immunisierung und Immunabsorption wurde Fibrinogen und sein Spaltprodukt D in der Follikelflüssigkeit dargestellt. Das typische Sekretprotein Lactoferrin kommt in der Follikelflüssigkeit nicht vor.

- 3.) Die Blutplasmaproteine gelangen durch Transsudation in die Follikelflüssigkeit. Die meisten Komponenten der Follikelflüssigkeit stehen im Equilibrium mit entsprechenden Konzentrationen im Blutserum. Eine durch das Molekulargewicht terminierte Selektion von Proteinen findet im Bereich sehr großer Moleküle statt. Die Ausschlußgrenze der Blut-Follikel-Barriere scheint zwischen MG 850.000 und MG 900.000 zu liegen.

Die physiologischen Funktionen der Follikelflüssigkeit werden besonders im Hinblick auf die analysierte Proteinausstattung diskutiert; nutritive und regulative Partialfunktionen bei der Eizellreifung, Ovulation, Spermien capacitation und Befruchtung.

VI. Literaturverzeichnis

BAHR, J., KAD, L. and NALBANDOV, A.V.:

The role of catecholamines and nerves in ovulation.
Biol. Reprod. 10, 273 - 290 (1974)

BECK, L.R. and SHELDEN, R.M.:

Antigenicity of rat follicular fluid. Fertil. Steril. 23,
910 - 914 (1972)

BEIER, H.M.:

Biochemisch-entwicklungsphysiologische Untersuchungen
am Proteinmilieu für die Blastocystenentwicklung des
Kaninchens (*Cryptolagus cuniculus*). Zool.Jb.Anat. 85,
72 - 190 (1968)

BEIER, H.M.:

Oviducal and uterine fluids. J.Reprod.Fert. 37, 221 - 237 (1974)

BEIER, H.M.:

Uteroglobin and related biochemical changes in the reproductive
tract during early pregnancy in the rabbit. J.Reprod.Fert.,
Suppl. 25, 53 - 69 (1976)

BEIER, H.M., PETRY, G. and KÜHNEL, W.:

Endometrial secretion and early mammalian development.
In: Mammalian Reproduction (H. Gibian and E.J. Plotz, Eds)
pp. 264 - 285, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1970)

BJERSING, L. and CAJANDER, S.:

Ovulation and the mechanism of follicle rupture
IV. Ultrastructure of membrane granulosa of rabbit
graafian follicles prior to induced ovulation
Cell.Tiss.Res. 153, 1 - 14 (1974)

BJÖRKMAN, N.:

A study of the ultrastructure of the granulosa cells
of the rat ovary. Acta anat. 51, 125 - 147 (1962)

BOSTRÖM, H. and ODEBLAD, E.:

Autoradiographic observations on the uptake of S^{35} in the
genital organs of the female rat and rabbit after injection of
labelled sodium sulfate. Acta endocrin. (Kbh.) 10, 89 - 96 (1952)

BRAMBELL, F.W.R.:

The development and morphology of the gonads in the mouse. (3.)
The growth of the follicles. Proc.Roy.Soc.B. 103, 258 (1928)

BRAMBELL, F.W.R.:

Ovarian changes. In: A.S.Parkes (Ed.) Marshall's Physiology of
Reproduction Vol. 1, chap. 5, Longmans Green, London (1960)

BYSKOV, A.G.S.:

Ultrastructural studies on the preovulatory follicle in the
mouse ovary. Z.Zellforsch. 100, 285 - 299 (1969)

CAJANDER, S.:

Structural alterations of rabbit ovarian follicles after mating
with special reference to the overlying surface epithelium.
Cell.Tiss.Res. 173, 437 - 449 (1975)

CALL, E.L. and EXNER, S.:

Zur Kenntnis des Graaf'schen Follikels und des Corpus Luteum
beim Kaninchen. S.B.Akad.Wiss. Wien 71, Abt. 3, 321 (1975)

CARAVAGLIOS, R. and CILOTTI, R.:

A study of the proteins in the follicular fluid of the cow.
J. Endocrin. 15, 273 - 278 (1957)

CERLETTI, P. and ZICHELLA, L.:

Nucleotidases, nucleotides, vitamins and coenzymes in the
follicular fluid of human ovary. Clin.Chim.Acta 6, 502 - 503 (1961)

CRAN, D.G., MODRE, R.M. and HAY, M.F.:

Permeability of ovarian follicles to electron-dense macromolecules,
Acta endocr. (Kbh.) 82, 631 - 636 (1975)

DESJARDINS, C., KIRTON, K.I. and HAFE, H.D.:

Some chemical, immunochemical and electrophoretic properties of
bovine follicular fluid. J.Reprod.Fert. 11, 237 - 244 (1966)

EDWARDS, R.G.:

Follicular fluid. J.Reprod.Fert. 37, 189 - 219 (1974)

ESPEY, L.L.:

Decomposition of connective tissue in rabbit ovarian follicles by multivicular structures of thecal fibroblasts. *Endocrinology* 88, 437 - 444 (1971)

ESPEY, L.L.:

Ovarian proteolytic enzymes and ovulation
Biol. Reprod. 10, 216 - 235 (1974)

GLASS, L.E.:

Transmission of maternal proteins into oocytes.
Advanc Biosciences 5, 29 - 58 (1971)

GOA, J.:

A micro biuret method for protein determination
Scand. J. clin. Invest. 5, 218 (1953)

GRADAR, P. et WILLIAMS, C.A.:

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 10, 195 (1953)

HADEK, R.:

Electron microscope study on primary liquor folliculi secretion in the mouse ovary. *J. Ultrastruct. Res.* 9, 445 - 458 (1963)

JENSEN, C.E. and ZACHARIAE, F.:

Studies on the mechanism of ovulation: isolation and analysis of acid mucopolysaccharides in bovine follicular fluid. *Acta endocrin. (Kbh.)* 27, 356 - 368 (1958)

JOHNSON, M.H.:

Physiological mechanism for the immunological isolation of spermatozoa. In: *Advances in Reprod. Physiology Vol. VI* (M.W.H. Bishop, Ed), Logos Press, London, (1973)

JONES, E.E. and NALBANDOV, A.V.:

Effects of intrafollicular injection of gonadotropins on ovulation or luteinization of ovarian follicle.
Biol. Reprod. 7, 87 - 93 (1972)

JUNG, G.:

Stoffwechselvorgänge im Ovar im Hinblick auf Follikelreifung und Ovulation. Arch.Gynäk. 207, 124 - 135 (1957)

KIRCHNER, C.:

Untersuchungen an den uteruspezifischen Glykoproteinen während der frühen Gravidität des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) Wilhelm Roux'Archiv 164, 97 - 133 (1969)

LOBEL, B.L. and LEVY, E.:

Enzymic correlates of development, secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary. Acta endocrin. (Kbh.) Suppl. 132, 7 - 33 (1968)

LUTWAK-MANN, C.:

Note on the chemical composition of bovine follicular fluid. J.Agric.Sci. 44, 477 - 480 (1954)

MANARANG-PANGAN, S. and MENGE, A.C.:

Immunologic studies on human follicular fluid. Fertil. Steril. 22, 367 (1971)

MANCINI, R.E., VILAR, O., GOMEZ, C., DELACHA. J.M., DAVIDSON, O.W. and CASTRO, A.:

Histological study of distribution of fluorescent serum proteins in connective tissue. J. Histochem. Cytochem. 9, 356 - 362 (1961)

MANCINI, R.E., VILAR, O., DELACHA, J.M., DAVIDSON, O.W. and ALVAREZ, B.:

Extravascular distribution of fluorescent albumin, globulin and fibrinogen in connective tissue. J.Histochem.Cytochem. 10, 194 - 203 (1962)

MANCINI, R.E., VILAR, O., HEINRICH, J.J., DAVIDSON, O.W. and ALVAREZ, B.:

Transference of circulating labelled serum proteins to the follicle of the rat ovary. J.Histochem.Cytochem. 11, 80 - 88 (1963)

MAURER, H.R.:

Disc Electrophoresis and Related Techniques of
Polyacrylamide Gel Electrophoresis., K. Fischbeck (Ed.)
Walter de Gruyter, Berlin - New-York (1971)

McGAUGHEY, R.U.:

A comparison of the fluids from small and large ovarian
follicles of the pig. Biol. Reprod. 13, 147 - 153 (1975)

McGAUGHEY, R.U. and DANIEL, J.C.:

Protein patterns of ovarian follicular fluids from pigs.
Biol.Reprod. 7, 128 (1972)

ODEBLAD, E.:

A biophysical study on the ovarian follicular fluid.
Acta endocrin. (Kbh.) 11, 269 - 274 (1952)

ODEBLAD, E.:

Studies on the physiology of the follicular fluid.
Acta endocrin. (Kbh.) 15, 313 - 316 (1954)

OLDS, D. and VANDEMARK, N.L.:

Composition of luminal fluids in bovine female genitalia.
Fertil. Steril. 9, 345 - 354 (1957)

UCHTERLONY, G.:

Diffusion-in-gel method for immunological analysis.
In: Progress in allergy, Vol. 5, I (P. Kallée, Ed.)
S. Karger-Verlag, Basel (1958)

PARKES, A.:

The reproductive processes of certain mammals.
II The size of the graafian follicle at ovulation
Proc. Roy. Soc. B, 109, 185 (1931)

REIPE, G.:

Die Proteinaseen im Liquor folliculi und ihre Bedeutung für
den Follikelreife. Fermentforsch. 17, 2 - 8 (1943)

PETRY, G.:

Die Ursachen der Ovulation, Z. Geburtsh. u. Gynäk. 132,
236 - 243 (1949)

PETRY, G.:

Die Konstruktion des Eierstockbindegewebes und dessen Bedeutung für den ovariellen Zyklus, Z. Zellforsch. 35,
1 - 32 (1951)

ROBINSON, A.:

The formation, rupture and closure of ovarian follicles in ferrets and ferret-polecat hybrids and some associated phenomena. Trans.Roy.Soc.Edinb. 52, 303 (1918)

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik, 16. Auflage, R. Oldenbourg, München-Wien (1968)

RONDELL, P.:

Biophysical aspects of ovulation, Biol.Reprod. 2,
64 - 89 (1970)

RONDELL, P.:

Role of steroid synthesis in the process of ovulation. Biol. Reprod. 10, 199 - 215 (1974)

SCHULTZE, H.G. and HEREMANS, J.F.:

Molecular Biology of Human Proteins, Vol. 1,
Elsevier Publishing Company, Amsterdam - London - New-York (1966)

SEMM, K.:

Das Instrumentarium der gynäkologischen Pelviskopie, Endoscopy 2, 37 - 42 (1970)

SHALGI, R., KRAICER, P.F. and SOFERMAN, N.:

Human follicular fluid., J.Reprod.Fert. 31, 515 - 516 (1972)

SHIVERS, C.A., METZ, C.B. and LUTWAK-MANN, C.:

Some properties of pig follicular fluid., J.Reprod.Fert. 8,
115 - 120 (1964)

ZACHARIAE, F.:

Studies on the mechanism of ovulation: autoradiographic
observations on the uptake of radioactive sulfate S^{35} into
the ovarian follicular muconolysaccharides. Acta endocrin.
(Kbh.) 26, 215 - 223 (1957)

ZACHARIAE, F. and JENSEN, C.E.:

Studies on the mechanism of ovulation: histochemical and
physico-chemical investigations on genuine follicular fluids.
Acta endocrin. (Kbh.) 27, 343 - 355 (1958)

ZAMBONI, L.:

Comparative studies on the ultrastructure of
mammalian oocytes. In: Oogenesis, J.D. Biggers &
A.W. Schuetz (Eds.) 5 - 45, University Park Press,
Baltimore & Butterworths, London (1972)

ZAMBONI, L.:

Fine morphology of the follicle wall and follicle
cell-oocyte association. Biol.Reprod. 10, 125 - 149
(1974)

ZUCKERMAN, S.:

The ovary, Academic Press, New-York (1962)

Meinen hochverehrten Lehrern

Herrn Professor Dr. med. Gerhard Petry

und

Herrn Professor Dr. med. Dr. rer.nat. Henning Beier

bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Themenstellung, für die kritischen Beiträge zur Sachdiskussion und für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmöglichkeiten in Ihren Instituten.

Fräulein Ursula Nix, Frau Waltraud Müller, Frau Maria Petuelli, Herrn Ernst Fraedrich und Herrn Gerhard Plitzner sei an dieser Stelle sehr herzlich gedankt für die Beratung bei der technischen Durchführung der Arbeit.

Der überwiegende Teil dieser Untersuchungen wurde dankenswerterweise durch Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogrammes "Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung" (Be 524/4) ermöglicht.

Lebenslauf

Am 26. September 1948 wurde ich, Rainer Robert Engels, als viertes Kind der Eheleute Dr. Ing. Günther Engels und Anneliese Engels, geb. Ophey, verw. Debuch, in Duisburg geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule und danach das Humanistische Gymnasium in Aachen, an dem ich am 11. Juli 1967 die Reifeprüfung bestand.

Zum Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich als Student der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Nach bestandener Wechslerprüfung konnte ich zum Sommersemester 1968 das Studienfach wechseln und das Medizinstudium aufnehmen. Nach bestandener naturwissenschaftlicher und ärztlicher Vorprüfung legte ich im August 1974 das medizinische Staatsexamen ab.

Nachdem ich 12 Monate als Medizinalassistent an einem Krankenhaus mittlerer Größenordnung angestellt war, wurde mir im Oktober 1975 die Approbation als Arzt erteilt. Im Januar 1976 wurde ich zum Wehrdienst einberufen und bin derzeit als Truppenarzt der Bundeswehr tätig.

Seit dem Frühjahr 1971 arbeite ich an meiner Dissertation, die vorwiegend in Marburg entstand. Aufgrund eines Stellungswechsels meines akademischen Lehrers wurde auch eine Zusammenarbeit mit den Anatomischen Instituten in Kiel und Aachen erforderlich.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten der Philipps-Universität Marburg:

Ammon, Behrendes, Bommer, Brück,
Buchholz, Daume, Dimroth, Dölle,
Dombrowski, Dorer, Eissner,
Engelhardt, Exner, Friedrich,
Ganz, Gerdes, Graul, Hamelmann,
Hardewig, Havemann, Hensel,
Heuser, Hildebrandt, Hohorst,
Hort, Jacob, Karlson, Keil, Klaus,
Kleinsasser, Koecke, Koransky,
Korb, Kühnel, Linneweh, Ludwig,
Mahr, Martini, Nesswetha, Nöth,
Mullsch, Petry, Pots, Reim, Rodeck,
Rohen, Schleyer, Schmid, Schneider,
Seidel, Siegert, Straub, Strohmeyer,
Stuke, Thoenes, Uhlarik, Vakilzadeh,
Walcher, Wehrmeyer, Wendt.

Fotodruck Mainz, Aachen, Malteserstraße 9, am Ponttor, Telefon (02 41) 2 73 05
Betrieb: Neupforte 13, Nähe Markt